

**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Ludwig-Maximilians Universität
München**

Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Klein

**Die Rolle von Checkpointmolekülen für Prognose
und Therapie der kindlichen akuten
lymphoblastischen Leukämie**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der
Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität zu München



Vorgelegt von Mareike Lepenies
aus Solingen

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter:	<u>Prof. Dr. Tobias Feuchtinger</u>
Mitberichterstatter:	<u>PD Dr. Dr. Ulrich Andergassen</u>
	<u>Prof. Dr. Marion Subklewe</u>
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	<u>Dr. med. Franziska Blaeschke</u>
Dekan:	<u>Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel</u>
Tag der mündlichen Prüfung:	<u>04.03.2021</u>

Et es wie et es,
et kütt wie et kütt
un et hätt noch emmer joot jejange.

(Rheinisches Grundgesetz Artikel 1-3)

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	6
2	Einleitung	10
2.1	Kindliche akute lymphoblastische Leukämie (ALL)	10
2.1.1	Einführung	10
2.1.2	Ätiologie und Epidemiologie	10
2.1.3	Diagnosestellung und Einteilung	11
2.1.4	Prognose	13
2.1.5	Therapie (CoALL 08-09 Studie)	14
2.2	Immuntherapeutische Ansätze	15
2.2.1	Entwicklung der Immuntherapie	15
2.2.2	Tumor-Immune-Escape	16
2.2.3	Neue Therapieansätze bei Leukämien	18
2.2.3.1	Therapie der fortgeschrittenen ALL mit Blinatumomab	18
2.2.3.2	Die Verwendung von Immuncheckpointinhibitoren	19
2.3	Ziele und Fragestellung unserer Analysen	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Zelllinien	25
3.1.2	Lösungen, Medien und Seren für Zellkultur	26
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	27
3.1.4	Puffer und Lösungen	28
3.1.5	Antikörper für die Durchflusszytometrie	28
3.1.6	Immunfluoreszenzantikörper	29
3.1.7	Reaktionskits	30
3.1.8	Verbrauchsmaterialien	31
3.1.9	Geräte und Software	32
3.2	Methoden	35
3.2.1	Patientenproben und gesunde Vergleichsproben	35
3.2.2	Zellbiologische Methoden	35
3.2.2.1	Zellkultur	35
3.2.2.2	Auftauen von Zellen	35
3.2.2.3	Stimulation der Blasten mittels TNF- α und IFN- γ	36
3.2.2.4	Bestimmung der Zellzahl	36
3.2.3	Durchflusszytometrie	36
3.2.3.1	Extrazelluläre Färbung	36
3.2.3.2	Intrazelluläre Färbung	37
3.2.3.3	Kompensation	38
3.2.3.4	Auswertung	38
3.2.4	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.4.1	RNA-Isolation	40
3.2.4.2	DNA-Isolation	40
3.2.4.3	Mengen- und Qualitätsbestimmung von RNA und DNA	40
3.2.5	Immunfluoreszenzfärbung	40
3.2.5.1	Vorbereitung der Proben	40
3.2.5.2	Färbung der Proben und Auswertung	41
3.2.6	Statistik	42
		43
4	Ergebnisse	44
4.1	Charakteristika der Patienten und gesunden Probanden	44

4.2	Signifikante Unterschiede im Surfaceome von ALL-Blasten und gesunden B-Vorläuferzellen	46
4.3	Überexpression von cytoplasmatischem PD-L1 bei ALL Patienten	49
4.4	ALL Checkpointexpression unter Simulation einer T-Zellantwort mittels TH1-Stimulus in vitro	50
4.5	Signifikante Veränderung der T-Zell-Subpopulationen im Knochenmark von ALL Patienten	51
4.6	Die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen bei Diagnosestellung hat keinen Einfluss auf die Rezidivwahrscheinlichkeit	56
4.7	Signifikante Unterschiede in der Expression von Markern der T-Zellerschöpfung im Knochenmark von ALL Patienten und gesunden Probanden	57
4.8	Der ko-inhibitorische und ko-stimulatorische Immunphänotyp der Blasten hat keinen Einfluss auf die Rezidivwahrscheinlichkeit	62
4.9	Patienten mit ALL Rezidiv zeigen schon bei Erstdiagnose eine veränderte Markerexpression der T-Zell-Erschöpfung	63
4.10	Patienten mit hoher Frequenz TIM-3 ⁺ und TIM3 ⁺ /PD1 ⁺ Knochenmark-T-Zellen haben ein signifikant höheres Rezidivrisiko	67
4.11	Die Checkpointexpression auf Leukämiezellen und Expression der Exhaustion-Marker auf T-Zellen zeigen keinen Zusammenhang mit dem MRD-Level oder Therapieansprechen	71
4.12	Weitere Expression von immunmodulatorischen Molekülen im Knochenmark	72
4.13	Immunfluoreszenzfärbung von PD-L1 auf Blasten	73
5	Diskussion	74
5.1	Ziel dieser Arbeit	74
5.2	Wichtigste Erkenntnisse unserer Analysen	74
5.2.1	Vergleich der ko-inhibitorischen Checkpointexpression auf Blastenseite zwischen gesunden Kindern und Kindern mit B-Vorläufer ALL	74
5.2.2	Cytoplasmatisches PD-L1 mit großer Streuung bei ALL Patienten	76
5.2.3	Regulation der Expression ko-stimulatorischer Checkpoints auf Blasten folgt keinem einheitlichen Muster	77
5.2.4	Die Checkpointexpression verändert sich durch T-Zell Stimulus unabhängig vom Krankheitsverlauf	78
5.2.5	ALL Patienten zeigen im Knochenmark anteilig weniger CD8 ⁺ T-Zellen als gesunde Spender	79
5.2.6	Die Verteilung der T-Zelltypen und deren Erschöpfungszustand variiert bei Kindern mit und ohne Vorläufer B-ALL stark	80
5.2.7	Hohe TIM-3-Expression auf CD3 ⁺ /CD4 ⁺ T-Zellen im Knochenmark bei Erstdiagnose erhöhen das Rezidivrisiko	84
5.3	Ausblick und mögliche Konsequenzen	86
6	Zusammenfassung	87
7	Literaturverzeichnis	88
8	Anhang	93
9	Abbildungsverzeichnis	95
10	Tabellenverzeichnis	96
11	Eidesstattliche Erklärung	97
12	Danksagung	98

1 Abkürzungen

2B4	Natural Killer Cell Receptor 2B4
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
APC	Antigen-presenting cell
B	B-Zelle
BiTE	Bispecific T-Cell Engager
BTLA	B- and T-Cell Lymphocyte Attenuator
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CCR	Complete Cytogenic Response
CD8+ T	CD8 ⁺ T-Zelle
CEACAM1	Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1
CoALL 08-09 studies	Cooperative Acute lymphoblastic leukemia 08-09 studies
CRP	C-Reaktives Protein
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase I	Desoxyribonuklease I
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GvHD	Graft versus Host Disease
HMGB1	High Mobility Group Protein B1

HR	High-Risk
HSA	Humanes Serum Albumin
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSVgD	Herpes Simplex Virus glycoprotein D
HVEM	Herpes Virus Entry Mediator
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2	Interleukin-2
Kg	Kilogramm
LAG-3	Lymphocyte activated Gene 3
LDH	Lactatdehydrogenase
LIGHT	homologous lymphotoxin inducible expression and competes with HSV Glycoprotein D for binding to Herpesvirus entry mediator a receptor expressed on T-lymphocytes
LR	Low-Risk
LSECtin	Liver and lymphnode Sinusoidal Endothelial Cell-type lectin
LT- α	Lymphotoxin- α
MDSC	Myeloid derived supressor cells
MFI	Mean Fluorescence Intensity
Mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
MRD	Minimal residual disease
n.s	Nicht signifikant
NK	Natürliche Killerzelle
NKT	Natürliche Killer T-Zelle
NSCLC	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom

p53	p-53 Protein, Tumorsuppressor
PCR	Polymerase chain reaction
PCT	Procalcitonin
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L	Programmed Cell Death-Ligand
PFA	Paraformaldehyd
pRb	Retinoblastom-Protein
PtdSer	Phosphatidyl Serine
RIN	RNA Integrity Number
RT	Raumtemperatur
SLAMF2	Signaling lymphocyte activation molecule family member 2
Std	Stunde
SZT	Stammzelltransplantation
Tcm	Central memory T cell
TCR	T-Zell-Rezeptor
Teff	Effector T cell
Tem	Effector memory T cell
TGF	Transforming-Growth Factor
TH1	T-Helfer Zelle 1
TIL	Tumor infiltrating Lymphocyte
TIM-3	T-Cell Immunoglobulin and mucin domain containing 3
Tn	Naive T cell
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
Trans	Transduziert
T-Reg	Regulatorische T-Zelle

Tscm/n	Stem cell-like memory/ Naive T cell
WBC	Weißer Blutkörperchen
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\gamma\delta$ T	$\gamma\delta$ -T-Zelle

2 Einleitung

2.1 Kindliche akute lymphoblastische Leukämie (ALL)

2.1.1 Einführung

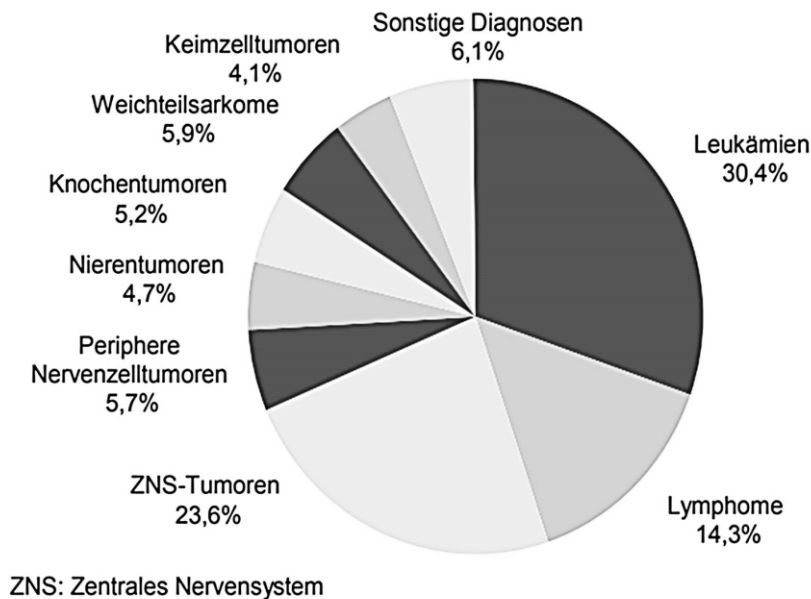
Leukämien stellen die größte Gruppe maligner Erkrankungen im Kindesalter dar. Bei pädiatrischen ALL Patienten mit Standardrisiko konnten die 5-Jahres-Überlebensraten in den letzten Jahrzehnten auf über 80 % gesteigert werden.[4] Patienten mit primär refraktärer oder rezidivierender Leukämie zeigen jedoch trotz vieler neuer Therapieoptionen und Stammzelltransplantation nur zu 10-20 % ein krankheitsfreies Intervall von mindestens fünf Jahren und profitieren von neuen Ansätzen in der Immuntherapie.[5, 6]

An Leukämie erkrankte Patienten fallen in der Regel durch unspezifische Symptome wie Hepatomegalie, Splenomegalie, Blässe, Fieber und Hämatome auf. Zudem werden abdominelle Schmerzen, Gewichtsverlust, häufige Infekte und Schmerzen in den Knochen von einigen Patienten angegeben.[7]

2.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Leukämien entstehen bei bisher ungeklärter Ursache durch die unkontrollierte Vermehrung mutierter maligner Zellen, die sich innerhalb der Leukozytogenese entwickeln. Im Falle einer Vorläuferzell-Leukämie ist dies ein mutierter Blast, der sich meist im Knochenmark befindet und der B- oder T-Zellreihe angehört. Die Vermehrung der nicht funktionellen Leukämiezellen im Knochenmark behindert die Entwicklung der regulären funktionsfähigen Zellreihen (Thrombozyten, Erythrozyten, Leukozyten), was zur Ausbildung der oben beschriebenen Symptome führt. Im Verlauf kommt es zur Ausschwemmung der Leukämiezellen ins periphere Blut. Im Endstadium spricht man von einem Versagen des Knochenmarks.[8]

Leukämien im Kindesalter machen in Deutschland mit 30,4 % den größten Anteil kindlicher maligner Erkrankungen aus. Davon stellt die akute lymphoblastische Leukämie den überwiegenden Anteil dar (Abbildung 1).



*2009-2015, basierend auf insgesamt 14791 unter 18-jährigen Patienten

Abbildung 1: Relative Häufigkeiten der an das Deutsche Krebsregister gemeldeten kindlichen Krebserkrankungsfälle nach Diagnose-Hauptgruppen

Quelle: Deutsches Kinderkrebsregister 2016

Jungen sind etwa 20 % häufiger betroffen als Mädchen. Die Inzidenz bei Kindern ≤ 15 Jahren liegt bei 1/1200. Der Erkrankungsgipfel liegt im Vorschulalter bei zwei bis vier Jahren.[9]

2.1.3 Diagnosestellung und Einteilung

Bei Verdacht auf Leukämie erfolgt zunächst eine Blutentnahme, in der Blutgerinnung, Blutbild und klinisch-chemische Parameter untersucht werden. Die Minderung einer Zellreihe bis hin zur Panzytopenie (Verminderung aller Zellreihen) unterstützt den Verdacht einer hämatologischen Erkrankung und erfordert weitere Maßnahmen.[10]

Die Diagnosestellung erfolgt mittels einer Kombination aus Klinik und Knochenmarkpunktion mit Knochenmarksausstrich zur Detektion zytogenetischer Veränderungen und einer Mitbeurteilung des ZNS.

Bei der Einteilung der ALL wird zwischen Vorläuferzellen und ausgereiften Zellen unterschieden sowie zwischen der T- und B-Zellreihe. Nur ca. 10-15 % der akuten lymphoblastischen Leukämien entstammen von T-Vorläufer-Zellen.[11]

Tabelle 1: Einteilung der ALL

[1, 2]

	<i>B-ALL</i>	<i>T-ALL</i>
<i>Precursor ALL</i>	Pro-B-ALL	Early T-ALL
	cALL (common)	Intermediate T-ALL
	Pre-B-ALL	
<i>Mature ALL</i>	Mature B-ALL	Mature T-ALL

Zwischen lymphoblastischem Lymphom und lymphoblastischer Leukämie wird anhand des Blastenstatus im Knochenmark unterschieden. Befinden sich >25 % Blasten im Knochenmark, spricht man von einer Leukämie.

Die weitere Klassifikation der B-Zellen erfolgt mittels morphologischer Untersuchung und Durchflusszytometrie, indem zelltypspezifische Antikörper zur Detektion verwendet werden.

[12]

Tabelle 2: Spezifische Oberflächenmarker der B-Zell-Leukämietypen

<i>ALL-Form</i>	<i>Oberflächenmarker</i>
B-Zell-Leukämien	CD19+, HLA-DR+, TdT+ u./o. CD79a+ u./o. cytoplasmatisch CD22+
	<i>Spez. Oberflächenmarker</i>
Pro-B-ALL	CD10-
cALL	CD10+, cyIgM-
Pre-B-ALL	CD19+, cyIgM+

Eine vermehrte Ausprägung spezifischer Oberflächenmarker kann zudem ein Hinweis auf eine chromosomale Veränderung sein und zur genaueren Klassifikation beitragen. Diese Aberrationen sind prognoserelevant.[13]

.

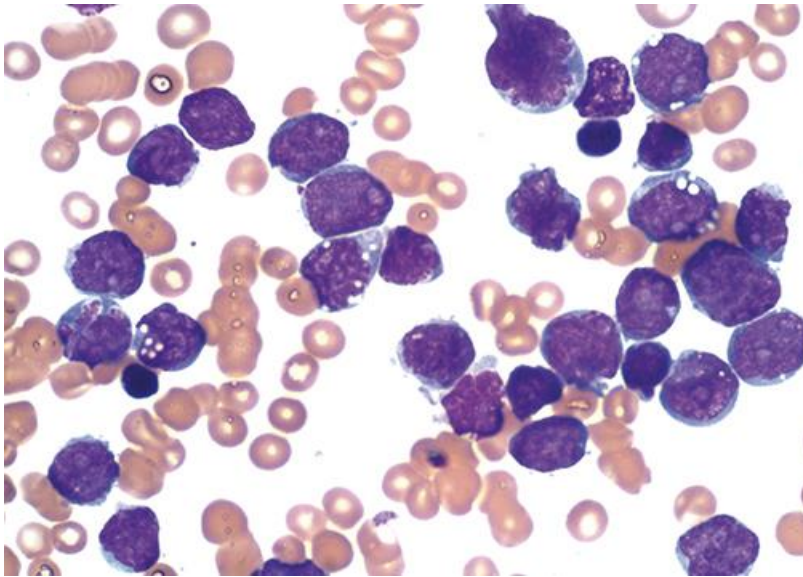


Abbildung 2: Knochenmarkausstrich eines Kindes mit akuter lymphoblastischer Leukämie

Der Ausschnitt eines Knochenmarkausstriches zeigt einen Befund mit hohem Blastenanteil (lila) und verschiedenen erythrozytären Entwicklungsstufen. Der physiologische Blastenanteil von 2-5 % wird bei diesem Patienten mit neuer Diagnose einer akuten lymphoblastischen Leukämie deutlich überschritten.

Quelle: Plattform Uptodate

2.1.4 Prognose

Neben der Morphologie und den chromosomalen Veränderungen ist die minimale Resterkrankung (MRD) an Tag 29 nach Induktion der prognostisch bislang relevanteste Marker.[14] Diese MRD wird im Knochenmark mittels Durchflusszytometrie und PCR untersucht. Patienten mit einem positiven MRD-Wert haben im Verlauf ein signifikant schlechteres Überleben als Patienten mit einem negativen MRD-Wert.[15] Der Cut-Off zwischen positiv und negativ wird individuell anhand der Sensitivität der Marker festgelegt. Mit einem positiven MRD-Wert an Tag 29 liegt die Wahrscheinlichkeit für ein 5-jähriges rezidivfreies Überleben bei nur ca. 59 %, während MRD-negative Kinder mit einem vergleichbaren Risikoprofil zu ca. 8 % ein rezidivfreies Überleben erwarten können.[16]

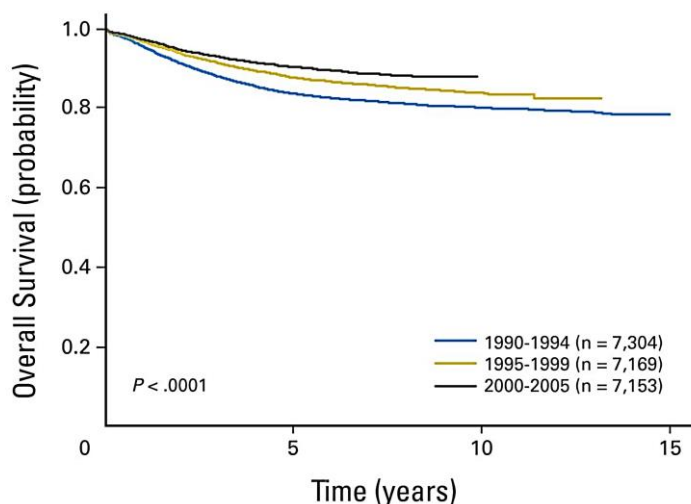


Abbildung 3: Gesamtüberleben bei Standardrisikopatienten von 1990-2005

Durch Weiterentwicklung der Therapieprotokolle konnte das Gesamtüberleben pädiatrischer ALL Patienten von 1990 bis 2005 stetig verbessert werden. Die Behandlung der Patienten erfolgte gemäß den jeweiligen klinischen Protokollen der Children's Oncology Group.

Quelle: Journal of Clinical Oncology [3]

Auch durch die Art der chromosomalen Veränderung wird die Prognose entweder positiv oder negativ beeinflusst.[17]

Die in ca. 3 % der Fälle auftretende t(9;22)(q34;q11) BCR/ABL1-Translokation, das Philadelphia Chromosom[18], korreliert bei pädiatrischen ALL Patienten mit einer schlechten Prognose. Wohingegen adulte Patienten mit Philadelphia-Chromosom-positiver CML durch den Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren bessere Prognosen zu erwarten haben.

Prognostisch ungünstig sind weiterhin rezidivierende und primär refraktäre Erkrankungen. Wichtige Prognosefaktoren sind außerdem die Zeit bis zur Entwicklung eines Rezidivs und dessen Lokalisation. Ein frühes Rezidiv, <18 Monate nach Erstdiagnose oder <6 Monate nach Therapieende, sowie ein medulläres Rezidiv, senken das 5-Jahresüberleben auf bis zu 21 %. Rezidiventwicklung unter noch laufender Therapie führt zu nochmals vermindertem 5-Jahres-Überleben. Zusätzlich negative Einflussfaktoren sind ein männliches Geschlecht, ein Alter von ≥ 10 Jahren, ein ZNS-Befall bei Diagnosestellung oder ein Vorliegen einer T-Vorläufer ALL.[19]

2.1.5 Therapie (CoALL 08-09 Studie)

Die Therapie der pädiatrischen ALL erfolgt in Therapieoptimierungsstudien (z.B. AIEOP-BFM ALL und CoALL 08-09), die zu kontinuierlich verbesserten Prognosen führen. Die hier untersuchten Proben entstammen der CoALL 08-09 Studie aus dem Universitätsklinikum in Hamburg-Eppendorf, weshalb sich die nachfolgenden Angaben auf dieses Protokoll beziehen. Der Behandlungsplan ist Abbildung 30 und Abbildung 31 zu entnehmen. Die erste Stratifizierung erfolgt bei Diagnosestellung des Protokolls in High-Risk-(HR) und Low-Risk (LR)-Gruppe (Tabelle 3).

Tabelle 3: 1. Risikostratifizierung gemäß CoALL-Protokoll 08-09 bei Diagnosestellung

Low-Risk	High-Risk
WBC < 25/nl UND	WBC ≥ 25/nl ODER
Prä-B/ cALL UND	Pro-B/ T-ALL ODER
< 10 Jahre	≥ 10 Jahre

Mittels einer 2. Risikostratifizierung werden die Kinder mit B-Vorläufer ALL anhand ihres MRD-Levels an Tag 29 und die Kinder mit T-Vorläufer-ALL anhand des MRD-Levels an Tag 43 durch den Karyotyp und das Vorliegen eines chromosomalen 11q23 Rearrangements in weitere Untergruppen eingeteilt. LR- und HR-Therapieschemata gliedern sich dann erneut in reduziert, standard und intensiviert auf. Anhand dieser Gruppen werden die Kinder mit Chemotherapie und ZNS-Prophylaxe individuell mit einer an ihr Erkrankungslevel angepassten Therapie versorgt.

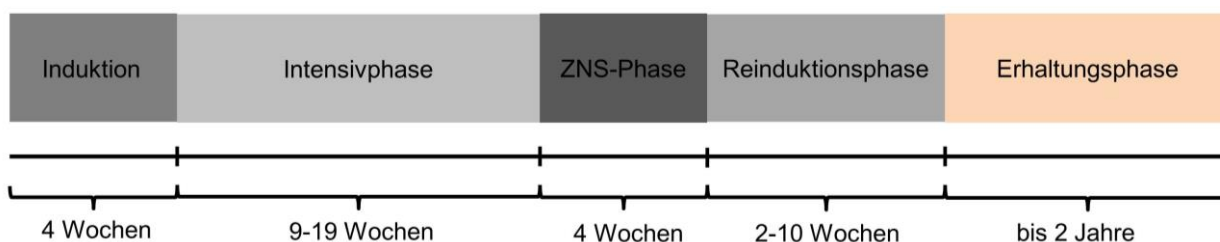


Abbildung 4: Therapieschema gemäß CoALL-Studienprotokoll

Variabilitäten in der Zeitachse entstehen durch Zuordnung zu unterschiedlichen Risikogruppen.

Quelle: Adaptiert an das Studienprotokoll CoALL 08-09

2.2 Immuntherapeutische Ansätze

2.2.1 Entwicklung der Immuntherapie

Die Verwendung von Immuntherapien ist heutzutage eine wichtige Therapieoption in verschiedenen medizinischen Bereichen. Die Entwicklung von Impfungen, zu Beginn die Pockenimpfung, die zu der Eradikation der natürlich vorkommenden Pockenkrankheit 1977 führte, schaffte massive Fortschritte.[20] Weitere Möglichkeiten das Abwehrsystem aktiv zu modulieren, führten zu etablierten Therapieoptionen. Seit dem 19. Jahrhundert werden Immuntherapien auch in der Behandlung maligner Erkrankungen eingesetzt.

In den 1860er Jahren injizierte William Coley ein Bakterienlysate aus *Streptococcus pyogenes* direkt in das mehrfach rezidierte Sarkom eines jungen Italieners. Grundlage hierzu waren Vorberichte über Sarkomreduktion bei Erysipelentwicklung. Durch Fortsetzung dieser Injektion wurden über mehrere Monate die Rückbildung des Tumors und ein Patientenüberleben von acht weiteren Jahren erreicht. Die Modifizierung dieser Therapie rückte aufgrund der starken Nebenwirkungen und der Weiterentwicklung anderer Therapieoptionen wie Strahlen- und Chemotherapie wieder in den Hintergrund.[21]

Auch Hypothesen von Paul Ehrlich aus dem frühen 20. Jahrhundert verfolgten Theorien zu Antisera gegen Tumore. Von ihm wurden erstmals Zusammenhänge zwischen der körpereigenen Immunabwehr gegen Infektionen und der Abwehr gegen Krebs erkannt.[22]

In den 80er Jahren wurde erstmals wieder die Immuntherapie gegen Tumore in den Fokus gerückt. Eine mehrfache intracavitäre sowie intradermale Injektion von *Bacillus Calmette Guérin* (BCG), führte bei Urothelkarzinomen zu einer deutlichen Besserung.[23] Diese Besserung wurde später auf die allgemeine Anregung des Immunsystems durch Pathogene zurückgeführt.[24]

2.2.2 Tumor-Immune-Escape

Wenngleich T-Zellen grundsätzlich in der Lage sind, Krebszellen zu detektieren und zu eliminieren, besitzen maligne Zellen Mechanismen, um eine Erkennung durch das Immunsystem zu verhindern (Abbildung 5).[25] Tumorzellen sind in der Lage sich

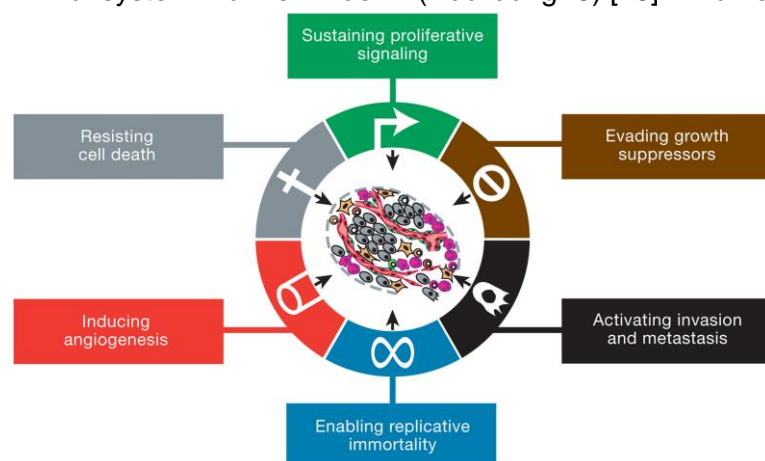


Abbildung 5: Spezielle Mechanismen eines Tumors für ein ungehindertes Ausbreiten

Schematische Darstellung einiger Fähigkeiten von Tumoren, die die Entwicklung maligner Erkrankungen erklärt. Mechanismen, die das ungehinderte Wachstum und die Ausbreitung erlauben sowie die eigene Versorgung gewährleisten, sind wichtige Eigenschaften, die maligne Erkrankungen ausmachen.

Quelle: Hallmarks of Cancer, Cell, 03/2011

unkontrolliert zu teilen und apoptotische Signale zu umgehen.[26]

Das Immunsystem ist theoretisch im Kontakt mit den Tumorzellen. Über zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, die fremde Zellen über den Major

Histocompatibility Complex (MHC) I erkennen, und CD4⁺ T-Helfer Zellen, die über eine Präsentation von

Tumorbestandteilen auf MHC II aktiviert werden, kann mittels Ausschüttung von Interferon (IFN)- γ und Zytokinen die Entstehung von Tumoren bis zu einem gewissen Stadium zurückgehalten werden. Ist ein Tumor einmal entstanden, kann er zumeist nicht durch das Immunsystem eradiziert werden. Kommt das Immunsystem nicht gegen die Tumorentwicklung an, kann dies zu einer dauerhaften Entzündungsreaktion führen.[27] Hierbei ist die Immunogenität des Tumors entscheidend. Eine hohe Mutationslast führt zu der Präsentation von Neoantigenen auf Tumorzellen und damit einer gesteigerten Immunogenität. Pädiatrische Tumore weisen in der Regel geringere Mutationslast auf und haben somit eine geringe Immunogenität.[28, 29] Eliminiert das Immunsystem nun die Zellen, die, durch die genetische Instabilität begründet, am immunogensten sind, so bleiben vermehrt schlecht erkennbare Tumorzellen zurück, die sich ungehindert weiter vermehren. Demzufolge könnte die Reaktion des Immunsystems, wenn sie nicht zur vollständigen Eradikation führt, in letzter Instanz sogar hinderlich für die Tumorbekämpfung sein.[27] Weitere bekannte Mechanismen zur Immunevasion bei Tumoren sind Herunterregulation von MHC-Molekülen auf der Oberfläche sowie Proteasom-Modifikationen.[30, 31] Des Weiteren kann Tumor-Immune-Escape auch über spezielle T-Zellen, die sogenannten T-Regs geschehen. Unter anderem über den Transforming-Growth-Factor (TGF)- β werden diese aus CD4⁺ T-Zellen in suppressive T-Regs verwandelt. Der Tumor schafft außerdem

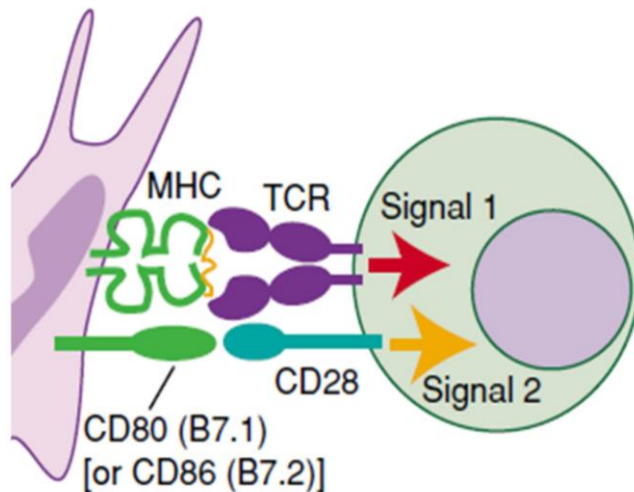


Abbildung 6: Interaktion zwischen T-Zelle und APC

Signal 1 stellt die Interaktion mittels MHC und TCR dar; über dieses Signal erreicht die T-Zelle die erste Information über ein präsentierte Antigen via APC und wird aktiviert. Signal 2 bezieht sich auf das Checkpointsignal, was in diesem Falle ko-stimulatorisch ist. Über diesen Ko-Signalweg wird dann entweder ein unterstützend-aktivierendes Signal generiert oder ein entgegengesetzt ko-inhibitorisches Signal vermittelt, was die Reaktion von T-Zelle gegen das Antigen verringert.

Quelle: Expert Reviews in Molecular Medicine, 2000, Cambridge University Press

ein immunsuppressives Umfeld. Auch myeloid derived suppressor cells (MDSCs) und dendritische Zellen (DC) helfen bei der Verhinderung von Apoptose, der Forcierung von Angiogenese und dem Erhalt des immunsuppressiven Umfeldes und unterstützen somit den malignen Prozess.[32, 33]

Die Kommunikation zwischen antigenpräsentierender Zelle (APC) und T-Zelle erfolgt sowohl über den T-Zell-Rezeptor/ MHC-Komplex als auch über ko-stimulatorische und ko-inhibitorische Signale (Imm checkpoints), die die

Immunantwort modulieren. Die Feinabstimmung sorgt zum einen für ausreichende Immunantworten, zum anderen für hinreichende Toleranz und ausbleibende autoimmune Reaktionen. Diesen Mechanismus können sich Tumorzellen zunutze machen, indem sie die Expression ko-inhibitorischer Proteine auf der Oberfläche hochregulieren und somit die Immunreaktion gegen den Tumor mindern.[34] Auf der anderen Seite kann auf T-Zellen die Expression sogenannter Exhaustion-Marker induziert werden und somit die Immunabwehr weniger effektiv werden.[35-37] Bekannte Exhaustion-Marker sind z.B. Programmed Cell Death-1 (PD-1), T-Cell Immunoglobulin and mucin domain containing 3 (TIM-3) und Natural Killer Cell Receptor 2B4 (2B4).

Die Erkenntnis über mögliche Immunevasions-Mechanismen in Tumoren führte dazu, dass neue Zielstrukturen für die Tumorthherapie entdeckt wurden und neue Therapieoptionen entstanden.

2.2.3 Neue Therapieansätze bei Leukämien

Immuntherapie hat unter anderem heutzutage einen hohen Stellenwert in der Therapie maligner Erkrankungen. Sie findet Anwendung bei Erwachsenen, erzielt aber je nach Form, wie beispielsweise den Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Zellen, auch bei pädiatrisch onkologischen Erkrankungen vielversprechende Ergebnisse.[38] Durch Immuntherapien mittels Antikörpern, Checkpointinhibitoren und CARs sowie gezielten Medikamenten für den Eingriff in spezifische Signalwege, sind neue Möglichkeiten in der Therapie der ALL entstanden.[5]

2.2.3.1 Therapie der fortgeschrittenen ALL mit Blinatumomab

Ein vielversprechender Therapie-Ansatz ist der bispezifische Antikörper Blinatumomab, der 1995 erstmalig beschrieben wurde und heute in der Therapie der rezidierten B- Vorläufer ALL als Medikament der ersten Wahl angewendet wird.[39]

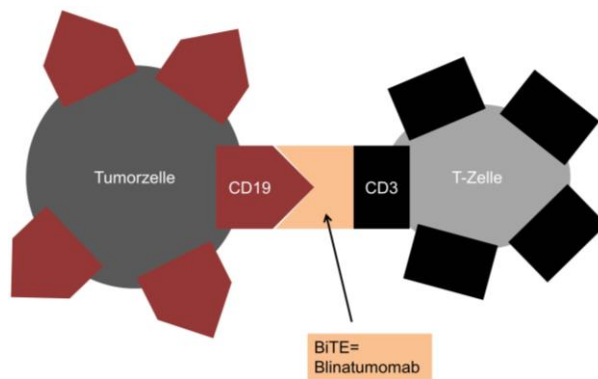


Abbildung 7: Wirkmechanismus von Blinatumomab

Blinatumomab bindet bispezifisch an CD19 auf der Leukämiezelle und CD3 auf der T-Zelle und induziert so eine Immunantwort der T-Zelle gegen die Leukämiezelle.

Quelle: In Anlehnung an „Blinatumomab: a bispecific T cell engager (BiTE) antibody against CD19/CD3 for refractory acute lymphoid leukemia“; J Hematol Oncol, 09/2015

Das synthetisch hergestellte Fusionsprotein induziert unabhängig von T-Zell-Rezeptor-Spezifität und MHC-Klasse eine T-Zell-Antwort. Es schafft eine räumliche Nähe zwischen T-Zelle und Leukämiezelle und löst durch Aktivierung der T-Zelle eine gezielte, effektive Immunantwort durch Granzyme und Perforin aus.[40, 41]

Blinatumomab ist sowohl bei adulter, als auch bei pädiatrischer ALL zugelassen und bietet neue Möglichkeiten für Hochrisiko Patienten mit einer B-Vorläufer ALL ab dem ersten Rezidiv oder bei frustraner Induktion oder Reinduktion.[42] So ergibt sich eine weitere Chance auf molekulare Remission.[36, 43]

In einer Studie aus Tübingen wurde gezeigt, dass durch die Therapie mit Blinatumomab sechs von neun behandelten Hochrisiko Patienten schnell in eine MRD-negative Remission kamen. Die Ergebnisse in Langzeitbeobachtungen zeigten jedoch, dass trotz initialer Remission 50 % der Patienten nach 21 Monaten verstarben.[43]

2.2.3.2 Die Verwendung von Immuncheckpointinhibitoren

Die ko-stimulatorische und ko-inhibitorische Funktion von Immuncheckpoints ermöglicht Angriffsoptionen in der Immuntherapie (Abbildung 6). 1987 entdeckten *Brunet et al.* den ko-inhibitorischen Immuncheckpoint Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4).[44] Dieser reguliert die frühe Aktivierung von naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen, indem er proportional zu der Stärke des TCR-Signals auf der Oberfläche der T-Zelle exprimiert wird und bei Ligandenbindung (CD80/CD86) die Aktivierung der T-Zelle herunterreguliert.[45] CTLA-4-Inhibitoren (Ipilimumab) führen in klinischen Studien zu einer Verstärkung der T-Zell-vermittelten Immunantwort z.B. gegen Melanome und Glioblastome.[46]

In Prostatatumoren konnten *Ness et al.* zeigen, dass sich Tumorzellen darüber hinaus durch Expression von Programmed Cell Death Protein Ligand 1 und 2 (PD-L1/2) der Kontrolle durch das Immunsystem entziehen können. Die Bindung von PD-L1/2 an ein auf der T-Zelle befindliches PD-1 führt zu einer Ko-Inhibition der T-Zelle und dadurch zu einer schlechteren Prognose bei einer hohen PD-L1/2-Expression auf Tumorzellen.[47] Die Kombination mehrerer Checkpoint-Inhibitoren gewinnt ebenfalls an Bedeutung, wie einige Melanomstudien zeigen. Bei Melanomen des Stadiums drei und vier zeigt eine gleichzeitige Blockade von CTLA-4 (Ipilimumab) und PD-1 (Nivolumab) ein verlängertes progressionsfreies Überleben von 11,5 Monaten im Median im Vergleich zu 2,9 Monaten bei Monotherapien mit Ipilimumab oder 6,9 Monaten bei Nivolumab.[48]

Die Behandlung der pädiatrischen ALL mit Checkpointinhibitoren bleibt bislang aufgrund der niedrigen Immunogenität Einzelfällen vorbehalten.[28] Vorberichte zeigen ein mögliches Ansprechen auf diese Inhibitoren, können aber bei Patienten mit Zustand nach allogener Stammzelltransplantation zu der Induktion einer fatalen Graft versus Host (GvHD)-Reaktion führen. Man geht davon aus, dass die Inhibition ko-inhibitorischer Checkpoints zu einer übersteigerten T-Zell-Aktivität führt und dadurch GvHD induzieren kann.[49, 50]

Für die T-Zell-Funktion spielen darüber hinaus der Phänotyp und das Ausmaß der Exhaustion eine wichtige Rolle. Erschöpfte T-Zellen produzieren weniger IL-2, sind weniger proliferativ, weniger zytotoxisch und können weniger proinflammatorische Zytokine freisetzen.[51] Klassische Marker für den Erschöpfungsgrad der T-Zelle sind TIM-3, CTLA-4, PD-1, 2B4 und Lymphocyte Activated Gene 3 (LAG-3).[51, 52] Sie sind ein Zeichen der reduzierten Funktion.[53] Diese Marker werden auf T-Zellen bei chronischen Infektionen und Tumorgeschehen vermehrt exprimiert [54, 55]. Des Weiteren findet sich eine verminderte Expression dieser Exhaustion-Marker bei unbehandelten Autoimmunerkrankungen, deren Steigerung durch die Blockade ko-inhibitorischer Checkpoints zu einer langfristigen Verbesserung der Symptome und damit zu neuen Therapieansätzen führen kann.[56] Bei TIM-3-Mutationen im Menschen wurde beispielsweise ein verstärktes Auftreten von autoimmunen Erkrankungen wie Asthma und Allergien beobachtet. Außerdem begünstigt ein niedriges Level an TIM-3-Expression auf T-Zellen im Liquor cerebrospinalis und im peripheren Blut eine Multiple Sklerose, was auf die fehlende Inhibition von Immunzellen zurückzuführen ist. In Tumoren war das Gegenteil auffällig.[57]

Von *Majzner et al.* wurde die PD-L1-Expression immunhistochemisch in 451 pädiatrischen Tumorerkrankungen bestimmt. In 9 % der untersuchten Tumore wurde PD-L1 positiv detektiert (>1 % PD-L1-Expression), am häufigsten in Burkitt Lymphomen (8 von 10 getesteten Proben, 80 %), Glioblastomen (5 von 14 getesteten Proben, 36 %) und

Neuroblastomen (17 von 118 getesteten Proben, 14 %). Die Expression konnte bevorzugt auf Tumor-assoziierten Immunzellen gefunden werden. Lymphozyten waren zu gleichen Prozentsätzen positiv und negativ für PD-L1 in diesen Tumoren. Eine positive PD-L1-Expression korreliert bei Neuroblastomen beispielsweise mit einem schlechteren Gesamtüberleben im Krankheitsverlauf.[58]

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die Checkpointexpression auf Blasten und T-Zellen bei kindlicher akuter lymphoblastischer Leukämie untersucht.[36] Es erfolgte die durchflusszytometrische Expressionsanalyse der oben erwähnten Checkpoints sowie der ko-inhibitorischen Moleküle Herpes Virus Entry Mediator (HVEM), LAG-3, PD-L2, B- and T-Lymphocyte Attenuator (BTLA), B7H3, B7H4, Galectin 9, CD160, CD200. Einige weitere ko-stimulatorische Checkpoints auf Tumorzellseite, wie 41BBL, CD278, CD27, CD40, CD70, CD80 und CD86 wurden ebenfalls untersucht.[36] Wir konnten zeigen, dass sich das Checkpointprofil von leukämischen Blasten signifikant vom Checkpointprofil gesunder B-Vorläuferzellen unterscheidet. Der ko-inhibitorische Marker PD-L1 war zudem zum Zeitpunkt eines Rückfalles höher exprimiert als bei der Erstdiagnose und ließ sich in vitro durch Simulation einer Th1-Antwort mit IFN- γ und TNF- α induzieren (Abbildung 8).[36] CD3⁺ T-Zellen gesunder Probanden exprimierten zudem die Exhaustion-Marker PD-1 und TIM-3 deutlich geringer als ALL Patienten.[36]

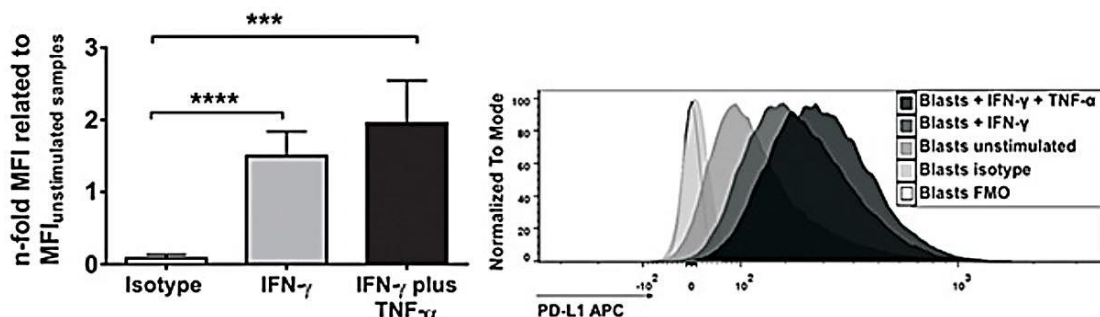


Abbildung 8: In vitro PD-L1 Induzierbarkeit auf Blasten

Links: Mediane der PD-L1-Induktion auf CD10⁺/CD19⁺ ALL-Blasten durch TH1-Zytokine nach 42-44 Std in-vitro-Inkubation mit TNF- α und IFN- γ in Balkenform dargestellt. Im Vergleich zu sehen sind FMO/Isotyp Kontrollen gegen nur IFN- γ -stimulierte und doppelt stimulierte Blasten mit TNF- α und IFN- γ . MFI: Mean Fluorescence Intensity; Statistisch ausgewertet mit Hilfe des paired t-Testes.

Rechts: Darstellung der PD-L1-Expression und Stimulierbarkeit auf den Knochenmark-Blasten eines Patienten nach der Inkubation mit den TH1-Zytokinen TNF- α und IFN- γ .

Grafiken aus Feucht et al. Oncotarget Nov. 2016

Tabelle 4: Übersicht der in dieser Studie untersuchten Immuncheckpoints

In Anlehnung an Feucht et al. Oncotarget Nov. 2016

Molekül	Ligand	Hauptfunktion	Therapeutikum	Expressionsort
2B4	CD48 SLAMF2	STIMULATION (-> im Kontakt mit Tumorzellen) INHIBITION (-> im Kontakt mit NK-Zellen)	Keine	CD8+ T, NK, Monozyten, Basophile, Eosinophile, $\gamma\delta$ T,
CD27	CD70	STIMULATION	Keine	T, B, NK
CD40	CD154	STIMULATION	Keine	B, DC, Monozyten, Makrophagen
CD70	CD27	STIMULATION	Keine	T, B, DC
CD80	CD28 CTLA-4 PD-L1	STIMULATION INHIBITION INHIBITION	Abatacept (indirekt)	T, B, DC, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen
CD86	CD28 CTLA-4	STIMULATION INHIBITION	Abatacept (indirekt)	T, B, DC, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen
CTLA-4	CD80 CD86	INHIBITION	Ipilimumab Abatacept	T, B, NK, NKT, Monozyten
HVEM	BTLA CD160 HSVgD LIGHT LT- α	INHIBITION INHIBITION STIMULATION STIMULATION	Keine	B, T, DC
LAG-3	MHC-II LSECtin	INHIBITION	Keine	T, NK
PD-1	PD-L1 PD-L2	INHIBITION	Pembrolizumab Nivolumab	T, B, NK, NKT, DC, Myeloie Zellen
PD-L1	PD-1 CD80	INHIBITION	Atezolizumab Avelumab Durvalumab	T, B, NK, DC, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen
TIM-3	Galectin-9 PtdSer HMGB1 CEACAM1	INHIBITION	Keine	T, NK, DC, Monozyten, Makrophagen

Abkürzungen: T: T-Zelle; B: B-Zelle; NK: Natürliche Killerzelle; NKT: Natürliche Killer T-Zelle; DC: Dendritische Zelle; PD-1: Programmed cell Death 1; PD-L: Programmed cell Death Ligand; LAG-3: Lymphocyte Activation Gene 3; LSECtin: Liver and Lymphnode Sinusoidal Endothelial Zelle C-type Lectin; HVEM: Herpesvirus Entry Mediator; LT- α : Lymphotoxin- α ; BTLA: B- and T-cell Lymphocyte Attenuator; HSVgD: Herpes Simplex Virus Glycoprotein D; TIM-3: T cell Immunoglobulin and Mucin-3; PtdSer: Phosphatidylserine; HMGB1: High Mobility Group Protein B1; CEACAM1: Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1, CTLA-4: Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4

Unsere Arbeitsgruppe konnte ein klinisches Ansprechen auf einen Checkpointinhibitor bei einer 12-jährigen Patientin mit fortgeschrittener therapierefraktärer B-Vorläufer ALL zeigen. Durch die Kombination aus der Gabe des Checkpointinhibitors Pembrolizumab einen Tag nach der Verabreichung von CD45RA depletierten T-Zellen eines haploid identischen Stammzellspenders, Blinatumomab am Folgetag, und weiterer Pembrolizumab-Gabe an Tag 18 und 29, konnte die morphologische Remission erzielt werden. Diese wurde anhand des MRD-Levels an Tag 34 nach Therapiebeginn festgestellt. Die Patientin erhielt noch zwei Tage Blinatumomab. Zwei Monate nach Therapieende entwickelte sie erneut einen Rückfall. [36]

Über eine weitere Anwendung innerhalb unserer Arbeitsgruppe bei einer neunjährigen Patientin mit therapierefraktärer T-ALL berichten *Boekstegers et al.*[49] Während das Mädchen nach Pembrolizumab-Gabe zunächst durch einen Abfall des MRD-Levels reagierte, kam es im Verlauf rasch zu einer fatalen Graft versus Host Disease (GvHD) mit wiederkehrend hohem MRD-Level.

Eine ähnliche Verlaufsform wurde zuvor von *Singh et al.*[50] bei einem Patienten mit Hodgkin Lymphom und vorangegangener Stammzelltransplantation beschrieben, ist jedoch bei anderen Patienten, die mit Checkpointinhibitoren behandelt wurden, nicht bekannt.[59] Eine detaillierte Analyse der Interaktion von T-Zelle und Leukämiezelle ist nötig, um die vorhandenen immuntherapeutischen Optionen für die pädiatrische akute lymphoblastische Leukämie zu verbessern.

2.3 Ziele und Fragestellung unserer Analysen

Mithilfe dieser Arbeit sollen neue Möglichkeiten für die Verwendung von Immuntherapien in der pädiatrischen Onkologie untersucht werden. Es soll anhand der Untersuchung in einem großen Patientenkollektiv die Relevanz von ko-stimulatorischen und ko-inhibitorischen Molekülen für die Interaktion der ALL mit T-Zellen analysiert werden.

Unsere Vorergebnisse zeigen, dass sich die Leukämiezellen signifikant von gesunden Vorläuferzellen unterscheiden und nach Stimulation durch ein TH1-Signal in der Lage sind ko-inhibitorische Moleküle auf die Oberfläche zu bringen. Diese Expression von Checkpointmolekülen soll nun systematisch an einer großen Kohorte und bei einem langen Follow-Up mit vielen Kofaktoren, wie MRD-Level, Geschlecht, Rezidivzeitpunkt, Alter, Form der ALL und Therapieansprechen analysiert werden. Auch die Frage nach prognostischer Relevanz der Checkpointexpression kann hierdurch möglicherweise neue Erkenntnisse gewinnen. Wünschenswert wäre Checkpointkombinationen als neue Therapieoptionen für

Patienten mit sehr schlechter Prognose zu detektieren, die aufgrund von gezielten therapeutischen Angriffsmechanismen die Prognose verbessern.

Außerdem wurde die Interaktion zwischen T-Zelle und Leukämiezelle im Knochenmark bislang nicht systematisch untersucht. Wir erwarten neue Erkenntnisse bezüglich der Ausbildung von T-Zell-Phänotypen bei B-Vorläufer ALL Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern. Wir suchen nach Veränderungen auf T-Zell-Seite, die die Entwicklung neuer Therapien initiieren könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Bezeichnung	Zusammensetzung
HEK293 PD-L1	DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep + 2 mM L-Glutamin
HEK293 WT	DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep + 2 mM L-Glutamin
Jurkat	RPMI + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep + 2 mM L-Glutamin
Nalm6	RPMI + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep + 2 mM L-Glutamin
Raji	RPMI + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep + 2 mM L-Glutamin
THP-1	RPMI + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep + 2 mM L-Glutamin

Die mit PD-L1 transduzierte Zelllinie HEK293T PD-L1 wurde freundlicherweise von Dr. Sebastian Kobold, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Klinikum der Universität München, zur Verfügung gestellt.

Die untersuchten Knochenmarkproben von ALL Patienten wurden von Prof. Martin Horstmann und Dr. Gabriele Escherich, CoALL Studie, Klinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Lösungen, Medien und Seren für Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Albiomin® 5% Infusionslösung Humanalbumin	Biotest Pharma GmbH, Dreieich, Deutschland
CliniMACS® PBS/EDTA Buffer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Fetal Calf Serum	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Humanes AB-Serum	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. R. Lotfi, Institut für klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm, Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuz Baden-Württemberg-Hessen, Ulm, Deutschland
IFN-γ	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
TNF-α	Cellgenix, Freiburg im Breisgau, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
VLE Dulbecco's MEM	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
(DPBS) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts
Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control	BD™ Bioscience, San Diego, USA
Compensation Particles Set	
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts
FACS Clean	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FACS Flow	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FACS Rinse	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Fix & Perm	Life Technologies™, Frederick, USA
Paraformaldehyde solution 4% in PBS	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI	Life Technologies™, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Quiazol® Lysis Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
RLT Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Terralin protect	Schülke und Mayr, Norderstedt, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim Deutschland
Trypanblau, 0,4 % Solution	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

3.1.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Basismedium	500 ml VLE RPMI 1640 Medium 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml L-Glutamin 50 ml FCS
Einfriermedium	70 ml VLE RPMI 1640 Medium 20 ml FCS 10 ml DMSO
HEK-Medium	500 ml VLE Dulbecco's MEM 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml L-Glutamin 50 ml FCS
Paraformaldehyd 3 %	15 ml Paraformaldehyde solution 4 % in DPBS
Staining Buffer	45 ml CliniMACS® PBS/EDTA Buffer 5 ml Albiomin® 5 % Infusionslösung Humanalbumin

3.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Fluorochrom	Typ, Clone	Verdünnung	Hersteller
2B4	APC	C1.7	1:20	Biolegend, San Diego, USA
CD10	BUV737	HI10a	1:100	BD Horizon, Franklin Lakes, USA
CD19	BUV496	SJ25C1	1:33,3	BD Horizon, Franklin Lakes, USA
CD27	BUV395	L128	1:20	BD Horizon, Franklin Lakes, USA
CD3	BUV395	SK7	1:50	BD Horizon, Franklin Lakes, USA
CD4	BV650	SK3	1:20	BD Horizon, Franklin Lakes, USA Horizon

CD40	BB515	5C3	1:50	BD Horizon, Franklin Lakes, USA
CD45RO	PE	UCHL1	1:33,3	Biolegend, San Diego, USA
CD62L	BB515	DREG-56	1:50	BD Horizon, Franklin Lakes, USA
CD70	PerCP/Cy5.5	113-16	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD8	PerCP/Cy5.5	SK1	1:50	Biolegend, San Diego, USA
CD80	PE	2D10	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD86	BV650	IT2.2	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CTLA-4 =CD152	APC	Monoklonal Maus, Clone BNI3	1:5	BD Horizon, Franklin Lakes, USA
HVEM	PE/Cy7	122	1:20	Biolegend, San Diego, USA
LAG-3	PE	Monoklonal, Maus, Clone 874501	1:10	R&D, Minneapolis, USA
live/dead	APC eFluor780	SK1	1:200	eBioscience, Waltham, Massachusetts, USA
PD-1	BV421	EH12.2H7	1:20	Biolegend, San Diego, USA
PD-L1	BV421	29E.2A3	1:20	Biolegend, San Diego, USA
TIM-3	BV785	F38-2E2	1:20	Biolegend, San Diego, USA

3.1.6 Immunfluoreszenzantikörper

a) Primärantikörper

Erkanntes Protein	Fluorochrom	Typ, Clone	Verdünnung	Hersteller
CD19	Alexa Fluor 594	HIB19	1:50	Biolegend, San Diego, USA
PD-L1	LEAF Purified	29E.2A3	1:100	Biolegend, San Diego, USA
PD-L1	Purified	MIH1	1:100	eBioscience, Waltham, Massachusetts, USA

b) Sekundärantikörper

Erkanntes Protein	Fluorochrom	Typ, Clone	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Goat, anti-mouse IgG (minimal x-reactivity)	Alexa Fluor 488	Poly4053	1:100	Biolegend, San Diego, USA

3.1.7 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Fix and Perm® Cell Permeabilization Kit	Life Technologies, Frederick, USA
RNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Art	Bezeichnung/ Hersteller
Deckgläschen	Menzel-Gläser 20x20 mm , Gerhard Menzel B.V & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Einfrierröhrchen	Cryo Pure Gefäß 1,8 ml, Sarstedt AG u. Co., Nümbrecht, Deutschland
Einweg-Zytologie Trichter, Single Cytofunnel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hautdesinfektionsmittel	<u>Cutasept®F</u> , BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland <u>Sterilium® classic pure</u> , BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Kompressen	Mullkompressen 10x10 cm, NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co. KG, Wetter, Deutschland
Multiwellplatten für Zellkultur, 6-Well, 12-Well	Costar® Corning Incorporated, New York, USA
Oberflächendesinfektionsmittel	<u>Ethanol 80 %</u> verg. MEK/Bitrex CLN GmbH, Niederhummel, Deutschland <u>Bacillol®AF</u> , Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Pipettenaufsätze	Pasteurpipetten aus Glas 230 mm, BRAND GmbH + Co, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen	<u>10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl Pipettenspitze</u> , Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland <u>0,1-2,5 µl, 2-100 µl, 2-200 µl, 100-1000 µl, Biosphere® Plus</u> , Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	<u>15 ml, 50 ml Falcon®</u> , Corning Science, New York, USA <u>15 ml</u> , Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland <u>50 ml</u> , Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien <u>1,5 ml, 2 ml</u> , Eppendorf Safe Lock Tubes, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Rundbodenröhrchen mit integriertem Zellsieb	5 ml Polystyrene Round Bottom Tube, Falcon®, Corning Science, Taunusstein, Deutschland
Sicherheitshandschuhe	Vaso® Nitril blue, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Stripetten	2 ml, 25 ml, Costar® Stripette®, Corning Incorporated, New York, USA 5 ml, 10 ml, Serological pipette, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen	T25, T75, T175, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

3.1.9 Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller
Autoklaven	<u>VX-150, Systec, Linden, Deutschland</u> <u>DX-65, Systec, Linden, Deutschland</u>
Brutschrank	HERAccl® CO ₂ -Inkubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA
Durchflusszytometer	<u>BD LSRFortessa™ cell analyzer</u> , BD, Franklin Lakes, USA
Zählkammer	Neubauer Zählkammer, Kammertiefe 0,1 mm, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Messung und Qualitätskontrolle der RNA/DNA	<u>Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer</u> , Nanodrop Technologies, Wilmington, USA <u>2100 Bioanalyzer</u> , Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Kühlgeräte	<u>Kühlschrank Comfort No Frost</u> , Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland <u>Gefrierschank (-20 °C) Premium No Frost</u> , Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland <u>Gefrierschrank (-86 °C) HERAfreeze™</u> <u>HFU T Serie</u> , Heraeus, Hanau, Deutschland <u>Kryotank MVE 600 Serie</u> , Chart, Luxemburg
Mikroskop	<u>Axiovert 25</u> , Zeiss, Oberkochen, Deutschland <u>Axiovert 200M</u> , Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipette (elektrisch)	Easypet® 3, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette (manuell)	2,5 µl, 20 µl, 200µ l, 1000 µl Eppendorf Research®, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Software	<u>FlowJo™ 10.3</u> , Ashland, Oregon, USA <u>GraphPad PRISM 7.0</u> , La Jolla, USA <u>Microsoft Office 2010</u> , Microsoft Cooperation, Redmond WA, USA <u>SPSS</u> , International Business Machines, Armonk, USA <u>FACS Diva</u> , BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey. USA
Sterile Werkbank	Uniflow KR-130, Uniequip, Planegg, Deutschland
Vakuumpumpe	Vakuumsytem BVC 21 NT, Vacuubrand GmbH + Co GmbH, Olching, Deutschland
Vortex Genie 3	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserbad	GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland

Zentrifugen	<u>Multifuge™ X3</u> , Heraeus, Hanau, Deutschland <u>Mikrozentrifuge Fresco™ 17</u> , Heraeus, Hanau, Deutschland
--------------------	---

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenproben und gesunde Vergleichsproben

Alle Patientenproben wurden uns freundlicherweise von der CoALL 08-09 Studie in Hamburg in Kooperation mit Herrn Prof. Martin Horstmann und Dr. Gabriele Escherich für dieses Projekt zur Verfügung gestellt. Alle Patienten bzw. deren Eltern/gesetzliche Vertreter gaben ihre schriftliche Zustimmung. Ein Ethikvotum liegt vor. Eingeschlossen wurden alle Proben, die bis zum Stichdatum 31.01.2017 mindestens sechs Jahre nachbeobachtet wurden und die Diagnose einer cALL oder Prä-B-ALL trugen (n = 106). Es handelt sich um Knochenmarkproben, die bei Erstdiagnose vor Therapiebeginn entnommen wurden. Proben von Patienten mit Pro-B-ALL und T-ALL wurden im Rahmen dieser Untersuchungen nicht eingeschlossen. Die Therapie aller Patienten erfolgte auf Basis des CoALL Protokolls 08-09. Für den Vergleich mit Knochenmarkzellen gesunder Spender wurden Proben von hämatoonkologisch gesunden Geschwisterspendern herangezogen, die im Rahmen einer Knochenmarkspende im Dr. von Haunerschen Kinderspital in München gewonnen wurden. Es fanden sich 13 geeignete Proben von gesunden Spendern zwischen ein und 14 Jahren, die demselben Versuchsablauf unterzogen wurden wie die Proben der ALL Patienten.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in Zwölf-Well-Platten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt.

3.2.2.2 Auftauen von Zellen

Die gefrorenen Patientenproben wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt, bis nur noch ein reiskorngroßer gefrorener Restbestand zu sehen war. Die Probe wurde sofort in 13 ml auf 37 °C vorgewärmtem FCS + 2 µl DNase I aufgenommen und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Probe anschließend in 5 ml Staining Buffer aufgenommen.

3.2.2.3 Stimulation der Blasten mittels TNF- α und IFN- γ

Bei ausreichend großen Patientenproben wurden mindestens 3×10^6 Zellen für eine 40-stündige Stimulation verwendet, um die Induzierbarkeit der Checkpointmoleküle durch TH1-Zytokine zu überprüfen. Das Volumen mit entsprechender Zellzahl wurde bei 450 g 5 min herunterzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes in 1 ml 37 °C warmen Basismedium aufgenommen und in einem Well einer Zwölf-Well-Platte ausgelassen.

Nach Zugabe von 0,2 μ l TNF- α /ml und 0,5 μ l IFN- γ /ml wurden die Zellen bei 37 °C kultiviert. Nach 40 Stunden wurden die Zellen gezählt und nach 5 min Zentrifugation auf 450 g in Staining Buffer aufgenommen.

3.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe von einer 1:2 Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer. Hierbei wurden 20 μ l Zellen in Staining Buffer und 20 μ l Trypanblau in eine Multiwell-Platte mit rundem Boden gegeben und vorsichtig durchmischt. Das Gemisch wurde in die Zählkammer pipettiert und diese in 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop analysiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte gemäß der Formel:

Konzentration [Zellen/ml] = Anzahl der gezählten Zellen pro Quadranten $\times 10^4 \times$ Verdünnungsfaktor

3.2.3 Durchflusszytometrie

3.2.3.1 Extrazelluläre Färbung

Patientenproben und Proben gesunder Kontrollen wurden gemäß 3.2.2.2 aufgetaut, ein zweites Mal zentrifugiert (450 g 5 min) und in Staining Buffer aufgenommen. Die für die Bestimmung der Oberflächenexpression verwendeten Panels sind in Tabelle 5 dargestellt. Abhängig von der in der Probe vorhandenen Zellzahl wurden die Panels mit folgender Priorisierung durchgeführt: Panel 1- inhibitorisch extrazellulär > Panel 2- stimulatorisch extrazellulär > T-Zell-Panel extrazellulär > Panel intrazellulär. Pro Ansatz wurden 5×10^5 Zellen in einem Gesamtvolumen von 50 μ l gefärbt, für das T-Zell-Panel extrazellulär betrug die Zellzahl 1×10^6 Zellen. Die detaillierten Informationen über die Antikörper sind 3.1.5 zu entnehmen. Die benötigten Antikörpermengen wurden vor Beginn des Projektes mittels Titration bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 10 min bei Dunkelheit/Raumtemperatur (RT). Die gefärbten Zellen wurden im Anschluss zweimal mit

1 ml Staining Buffer gewaschen, zentrifugiert (450 g 5 min), der Überstand abgesaugt und die Probe in einem Endvolumen von 500 µl Staining Buffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer BD LSR Fortessa™ cell analyzer.

3.2.3.2 Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen analog zu 3.2.3.1 zunächst für CD19, CD10 und der live/dead-Kontrolle extrazellulär gefärbt. Die verwendeten Antikörper und Mengen finden sich in 3.1.5 und Tabelle 5 wieder. Die Inkubation erfolgte bei Dunkelheit/RT für 15 min. Nach erfolgter Inkubation der Antikörper für die extrazelluläre Färbung folgte die Fixierung und Permeabilisierung mittels Fix and Perm® Cell Permeabilization Kit. Hierbei wurden 50 µl Reagent A zur Fixierung auf die Probe pipettiert und erneut 15 min bei Dunkelheit/RT inkubiert. Es folgte ein Waschschriff, in dem 1ml Staining Buffer auf die Probe pipettiert und bei 450 g für 5 min zentrifugiert wurde. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Pellet in 50 µl Reagent B zur Permeabilisierung aufgenommen. Zudem wurden die intrazellulär zu detektierenden Antikörper PD-L1 und CTLA-4 gemäß 3.1.5 hinzugegeben und 20 min bei Dunkelheit/RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe zweimal in 1 ml Staining Buffer gewaschen und in einem Endvolumen von 500 µl Staining Buffer aufgenommen. Bis zur Messung am Durchflusszytometer BD LSR Fortessa™ cell analyzer wurden die Proben lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Die benötigten Antikörpermengen wurden vor Beginn des Projektes mittels Titration bestimmt.

Tabelle 5: Auflistung der Panel-Zusammenstellung

Panel 1- inhibitorisch extrazellulär	Panel 2- stimulatorisch extrazellulär	Panel intrazellulär	T-Zell-Panel extrazellulär
APC CTLA-4 (1:5)	BUV395 CD27 (1:20)	APC CTLA-4 (1:5)	APC 2B4 (1:20)
PE LAG-3 (1:10)	BB515 CD40 (1:50)	BUV421 PD-L1 (1:20)	BUV421 PD-1 (1:20)
PE/Cy7 HVEM (1:20)	PerCP/Cy5.5 CD70 (1:100)	BUV737 CD10 (1:100)	BUV785 TIM-3 (1:20)
BUV785 TIM-3 (1:20)	PE CD80 (1:100)	BUV496 CD19 (1:33,3)	PE CD45RO (1:33,3)
BUV421 PD-L1 (1:20)	BV650 CD86 (1:100)	APC efluor780 live/ dead (1:200)	BB515 CD62L (1:50)
BV650 CD86 (1:100)	BUV737 CD10 (1:100)		BUV395 CD3 (1:50)
BUV737 CD10 (1:100)	BUV496 CD19 (1:33,3)		BV650 CD4 (1:20)
BUV496 CD19 (1:33,3)	APC efluor780 live/ dead (1:200)		PerCP/Cy5.5 CD8 (1:50)
APC efluor780 live/ dead (1:200)			APC efluor780 live/ dead (1:200)

3.2.3.3 Kompensation

Die automatische Kompensation wurde am Durchflusszytometer BD LSR Fortessa™ cell analyzer mittels Anti-Mouse Ig, κ/ Negative Control Compensation Particles Set gemäß Herstellerangabe durchgeführt. Für die Kompensation des zur live/dead-Bestimmung genutzten Kanals wurden tote Zellen (Inkubation für 20 min bei 65 °C) mit APC efluor780 live/dead Antikörper gefärbt. Bei unzureichender automatischer Kompensation erfolgte die Feinabstimmung der Kompensation manuell in FlowJo™ 10.3.

3.2.3.4 Auswertung

Die durchflusszytometrische Messung und Auswertung erfolgte mittels FACS Diva und FlowJo™ 10.3. Hierfür wurden unabhängig vom zu untersuchenden Zelltypen Zellen zunächst anhand ihrer Größe und Granularität mittels SSC-A und FSC-A ausgewählt. Darauf folgte der Ausschluss von Dubletten mittels FSC-A und FSC-H. Mithilfe des APC eFluor780 live/dead Antikörpers wurde auf lebende Zellen gegatet und weiter auf CD10⁺/CD19⁺ Blasten/B-Zell-Vorläufer oder auf CD3 und CD4 oder CD8 für die T-Zell-Subpopulationen. Mittels CD45RO und CD62L wurde jede T-Zell Population in vier verschiedene Phänotypen aufgetrennt: Stem cell-like memory T cells (Tscm)/Naive T cells (Tn), Central memory T cells (Tcm), Effector memory T cells (Tem) und Effector T cells (Teff). Im weiteren Verlauf wurden die angefärbten Checkpoints gegen SSC-A aufgetragen, um ihren Expressionsgrad auf oder in der Zelle zu bestimmen.

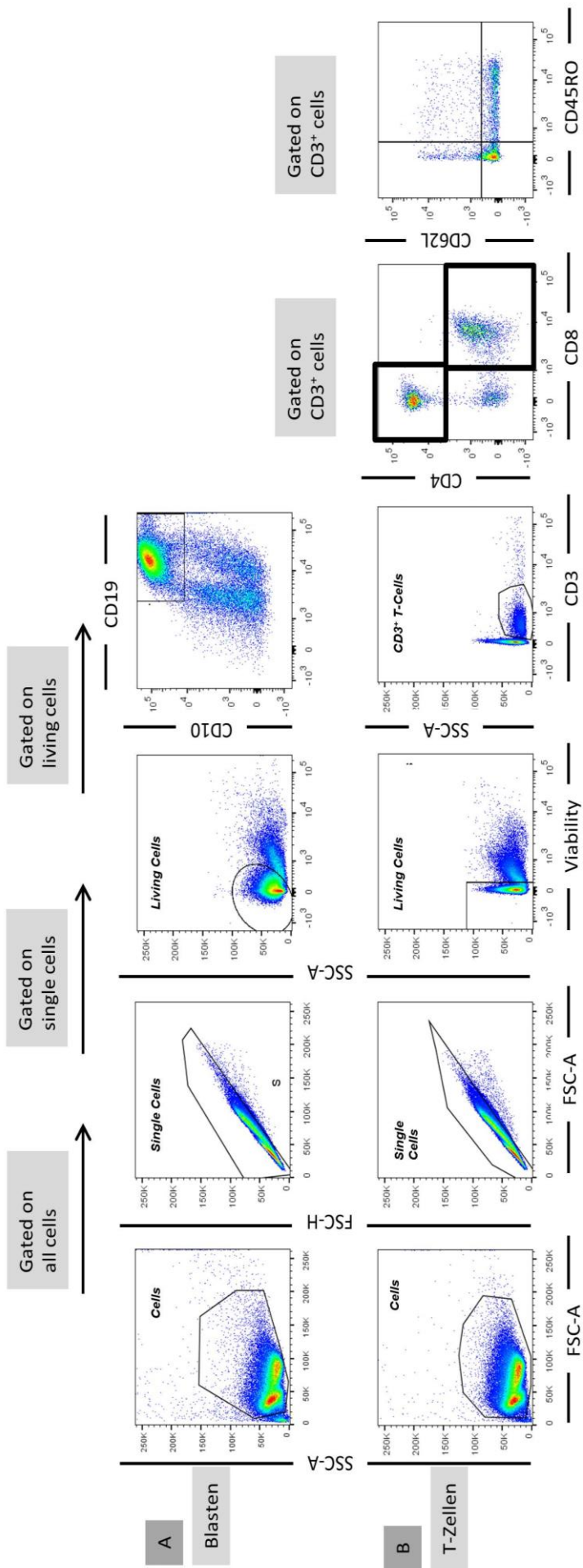


Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der Gatingstrategie.

(A) Für B-ALL-Blasten und gesunde B-Vorläuferzellen erfolgte das Gating auf Cells → Single Cells → Living Cells → CD10+/CD19+.

(B) Physiologische T-Zellen wurden detektiert mittels Gating on Cells → Single Cells → Living Cells → CD3+. Die weitere Unterteilung erfolgte in CD4-/CD8-T-Zellen und die T-Zell-Phänotypen. Tscm/Tn = CD62L+/CD45RO-, Tem = CD62L+/CD45RO+, Tef = CD62L-/CD45RO+.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 RNA-Isolation

Für die Isolation der RNA wurden je nach vorhandener Zellzahl 4×10^5 bis 1×10^6 Zellen in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen und bei -80 °C für maximal zwei Wochen gelagert. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangabe des RNEasy Mini Kits von Qiagen. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4.2 DNA-Isolation

Für die Isolation der DNA wurden je nach vorhandener Zellzahl 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen in 500 µl Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) aufgenommen und bei -80 °C für maximal zwei Wochen gelagert. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangabe des QIAamp DNA Mini Kits von Qiagen. Die isolierte DNA wurde dann bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4.3 Mengen- und Qualitätsbestimmung von RNA und DNA

Die RNA- und DNA-Konzentration wurde am Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer bestimmt. Die Kontrolle der RNA-Qualität geschah mittels 2100 Bioanalyzer und dem Agilent RNA 6000 Nano Kit. Anhand der vom Gerät generierten RNA Integrity Number (RIN) und des Gelbildes wurde beurteilt, welche RNA-Proben eine ausreichende Qualität für weitere Experimente (Sequenzierung, Real-Time-PCR) aufwiesen.

3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

3.2.5.1 Vorbereitung der Proben

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden sowohl adhärente als auch Suspensionszellen und die Patientenproben verwendet. Diese wurden sowohl extra- als auch intrazellulär gefärbt.

Die adhärenenten Zellen (HEK293 WT und HEK293 PD-L1) wurden trypsinisiert und mit maximal 3×10^5 Zellen auf einem Deckgläschen in einer Sechs-Well-Plate in HEK-Medium ausgebracht und für 48 Stunden inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 100 µl DPBS gewaschen und nach dem Absaugen mit 100 µl 3 %-igem PFA binnen 15 Minuten fixiert. Die fixierten Zellen wurden auf dem Deckgläschen weiter behandelt.

Um Patientenproben und Suspensionszellen per Immunfluoreszenzfärbung auf PD-L1 zu überprüfen, wurden 4×10^5 Zellen in 250 µl 3 %-igem PFA aufgenommen und für eine Stunde auf Eis gelagert. Nach einem Waschschrift mit Staining Buffer erfolgte die Aufnahme des Pellets in 250 µl Staining Buffer. Mithilfe eines Einweg-Zytologie-Trichters wurden die Zellen bei 500 g für 3 min auf einen Objektträger gebracht. Die beladenen Objektträger wurden durch Alufolie lichtgeschützt bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

3.2.5.2 Färbung der Proben und Auswertung

Für die extrazelluläre Färbung wurden die fixierten Zellen durch dreimaliges Auftropfen von 50 µl DPBS gewaschen. Der Alexa Fluor594 CD19 Antikörper wurde in einem 1:50 Verhältnis mit Staining Buffer aufgesetzt und für 1 h bei RT lichtgeschützt in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte das Absaugen des Antikörpergemisches vom Objektträger und erneut dreimaliges Waschen der Zellen durch DPBS. Die extrazelluläre Färbung wurde durch 15-minütige Inkubation mittels 3 %-igem PFA fixiert.

Es folgte dreimaliges Waschen und die Permeabilisierung mittels 0,1 %-igen Einsatz von Triton-X in PBS (0,1 µl Triton X in 99,9 µl DPBS). Hierfür wurden die Zellen für 15 min bei RT in oben beschriebenem Gemisch inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe. Der erste intrazelluläre Antikörper (Purified PD-L1) wurde in einem 1:100-Verhältnis mit Staining Buffer gemischt und auf die Zellen pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 45 min und wurde lichtgeschützt in einer feuchten Kammer durchgeführt. Durch dreimaliges Waschen mit DPBS wurde der Antikörper entfernt und der Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 Goat, anti-mouse IgG (minimal x-reactivity) in einer 1:100-Konzentration mit Staining Buffer auf die Zellen gegeben. Unter oben genannten Bedingungen wurde für 30 min inkubiert und erneut dreimal gewaschen.

Zuletzt wurde ein Tropfen des Mounting Mediums ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI auf die Zellen gegeben und Objektträger und Deckgläschen aufeinandergelegt. Der Objektträger wurde lichtgeschützt bei RT für mindestens 24 Stunden getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Deckgläschen mit klarem Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Die Analyse der Proben erfolgt unter dem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop.

Als Positivkontrolle für PD-L1 wurden PD-L1-transduzierte HEK-Zellen für 48 Stunden mit 200 ng/µl IFN-γ stimulierte THP-1-Zellen verwendet. Als Positivkontrolle für CD19 und CD10 wurden Raji-Zellen verwendet, als Negativkontrolle für alle Marker Wildtyp HEK-Zellen.

PD-L1-transduzierte HEK-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Sebastian Kobold, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Klinikum der Universität München zur Verfügung gestellt.

3.2.6 Statistik

Alle statistischen Tests wurden mithilfe der Programme Excel 2010, GraphPad Prism 7 und SPSS angefertigt. Die jeweiligen Tests sind unter den Abbildungen angegeben. Exakte P-Werte wurden mithilfe von Prism7 mittels „unpaired and non-parametric t-test“ errechnet, sobald per SPSS ein signifikanter Unterschied im „unpaired t-Test“ detektiert wurde.

In Fällen von sehr kleinen Bezugsgruppen und dadurch ggf. nicht verwertbaren Prozentangaben aufgrund von zu wenigen Ereignissen in der durchflusszytometrischen Auswertung wurde festgelegt, dass nur Bezugspopulationen mit ≥ 100 Events in die weiteren Analysen miteinbezogen werden. Daher können die untersuchten Fallzahlen n innerhalb der durchgeführten und dargestellten Analysen variieren.

Das Vorliegen einer Normalverteilung wurde mittels D'Agostino & Pearson Tests geprüft. Bei nicht vorhandener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels Mann-Whitney-Test berechnet, bei vorhandener Normalverteilung mithilfe des t-Tests - je nach Fragestellung entweder gepaart oder ungepaart.

Die Darstellung in „Box and Whiskers“-Form beinhaltet die 10- bis 90-Prozent-Perzentile und den Median. Ausreißer wurden als einzelne Punkte über und unter den Boxen dargestellt.

Signifikanzen, die auf dem Boden von durchflusszytometrischen Expressionsniveaus $< 5\%$ entstanden sind und rein graphisch kaum sichtbare Unterschiede aufweisen, werden dargestellt und im Fließtext erwähnt, allerdings, aufgrund der fraglichen Detektionsfähigkeit solcher Unterschiede mit Vorsicht gewertet oder zusätzlich separat in einer vergrößerten Darstellung aufgeführt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass einzelne Events durch ein zu grobes Gating in diesen Expressionsniveaus schnell zu signifikanten Unterschieden führen. Daher erfolgte in dieser Arbeit eine gesonderte Auswertung bei vorliegend niedrigen Expressionsniveaus von unter 5% .

Die mithilfe von Sternchen (*) angezeigten Signifikanzniveaus sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Beschreibung der verwendeten Signifikanzniveaus

<i>Markierung</i>	<i>Bedeutung</i>
*	p-Wert $\leq 0,05$
**	p-Wert $\leq 0,01$
***	p-Wert $\leq 0,001$
****	p-Wert $\leq 0,0001$

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Patienten und gesunden Probanden

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 100 Patientenproben und 13 Proben gesunder Probanden untersucht, deren Charakteristika in Tabelle 7 zusammengefasst sind.

Tabelle 7: Charakteristika der Patienten und gesunden Probanden

	<i>cALL</i>	<i>Prä-B-ALL</i>	<i>Gesunde</i>
Gesamt (n)	70	30	13
Weiblich	37	13	7
Männlich	33	17	6
Altersmedian bei ED	5 (1-17)	4,5 (1-16)	9,3 (1-13)
<10 Jahre bei ED (%)	84,3	73,3	76,9*
≥10 Jahre bei ED (%)	16,7	27,7	23,1*
Rezidiv (n)	10	4	
Frühes Rezidiv (<18 Monate nach ED)	2	1	
Spätes Rezidiv (≥18 Monate nach ED)	8	3	
Time to Relapse (Mittelwert Monate, Range)	29 (14-62)	27 (14-41)	
Therapieansprechen			
Complete Cytogenetic Remission (CCR, %)	94,3	93,3	
Late Responder (LR, %)	5,7	6,7	
MRD Tag 29 <10 ⁻³ (%)	68,6	80	
MRD Tag 29 ≥10 ⁻³ (%)	31,4	20	

*=Alter bei Spende

ED= Erstdiagnose, MRD=Minimal Residual Disease

70 % der untersuchten Patienten leiden an einer cALL (70/100), 30 % an einer Prä-B-ALL (30/100). In beiden Kohorten ist die Verteilung zwischen männlichen und weiblichen Patienten nahezu ausgeglichen.

84,3 % der cALL-Patienten sind bei Diagnosestellung <10 Jahre (59/70), 16,7 % sind ≥10 Jahre alt (11/70). Die Rezidivrate unter allen eingeschlossenen cALL-Patienten beträgt

14,3 % (10/70). Bei 20 % der Rezidive (2/10) handelt es sich um frühe Rezidive (<18 Monate nach Erstdiagnose (ED)), bei 80 % um späte Rezidive (8/10) (≥ 18 Monate nach ED). Im Mittelwert entwickelten sich in der hier untersuchten Kohorte Rezidive bei cALL-Patienten nach 29 Monaten. 94,3 % der beobachteten cALL-Patienten erreichen bei Therapie gemäß des CoALL 08-09 Protokolls eine Complete Cytogenetic Remission (CCR, <5 % Blasten im Knochenmark an Tag 29, kein extramedullärer Befall) (66/70). 5,7 % der Patienten mit cALL zählen zu den Late Respondern (LR) (4/70) (keine Remission an Tag 29 oder Remission erst nach zweitem HR1-Block). 31,4 % der Patienten zeigen an Tag 29 noch ein Minimal Residual Disease-Level (MRD) von $\geq 10^{-3}$ (22/70), 68,6 % hatten an Tag 29 keine nachweisbare MRD mehr (48/70) (MRD-Level $< 10^{-3}$).

Bei Erstdiagnose sind 73,3 % der Prä-B-ALL-Patienten <10 Jahren (22/30), während 26,7 % sich in der Gruppe ≥ 10 Jahre befinden (8/30). Die Rezidivrate unter den Prä-B-ALL-Patienten beträgt in dieser Kohorte 13 % (4/30), wobei es sich in 25 % der Fälle (1/4) um ein frühes Rezidiv handelt und bei 75 % (3/4) um ein spätes Rezidiv. Im Mittelwert entwickeln sich Rezidive bei Prä-B-ALL-Patienten dieser Kohorte nach 27 Monaten. 93 % der beobachteten Kinder zeigen an Tag 29 eine CCR (28/30). 7 % werden der Gruppe der Late Responder zugeteilt (2/30). 20 % der Patienten zeigen an Tag 29 noch ein MRD-Level von $\geq 10^{-3}$ (6/30), wohingegen 80 % der Prä-B-ALL-Patienten an Tag 29 keine nachweisbare MRD mehr aufweisen (24/30).

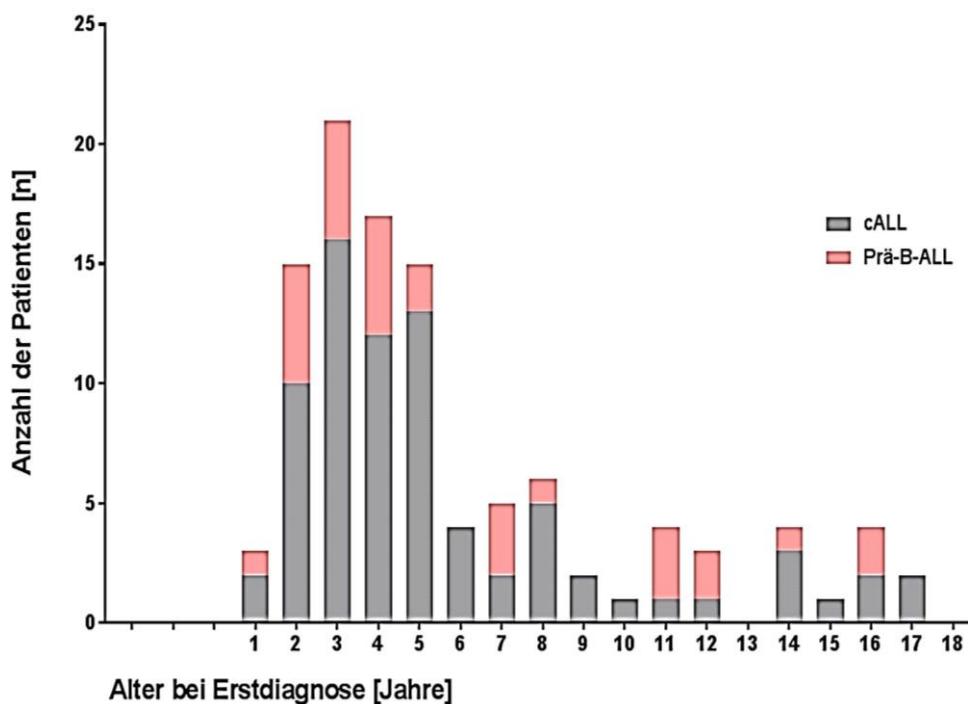


Abbildung 10: Altersverteilung der Patienten bei Diagnosestellung

Abbildung 10 zeigt die Altersverteilung der cALL- und Prä-B-ALL-Patienten bei Diagnosestellung in der hier untersuchten Kohorte. Patienten mit cALL sind bei Diagnosestellung im Median fünf Jahre alt (Range 1 bis 17 Jahre). Patienten mit Prä-B-ALL erkranken im Median mit einem Alter von 4,5 Jahren (Range 1 bis 16 Jahre).

Bei den für diese Studie rekrutierten 13 gesunden Vergleichsprobanden handelt es sich um Kinder mit einem Alter von 9,3 Jahren im Median (Range 1 bis 13 Jahre), die am Dr. von Haunerschen Kinderspital im Rahmen einer Matched-Sibling-Donor-Stammzellspende Knochenmark gespendet haben. 54 % der gesunden Probanden sind Mädchen (7/13), 46 % Jungen (6/13). 77 % sind <10 Jahre (10/13), 23 % ≥10 Jahre (3/13).

4.2 Signifikante Unterschiede im Surfaceome von ALL-Blasten und gesunden B-Vorläuferzellen

70 Knochenmarkproben von cALL-Patienten, 30 Proben von Prä-B-ALL-Patienten und 13 Proben von gesunden Spendern wurden hinsichtlich der Oberflächenexpression ko-inhibitorischer und ko-stimulatorischer Moleküle gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 11 zeigt die Unterschiede im ko-stimulatorischen Surfaceome der CD19⁺/CD10⁺ Blasten bei an B-Vorläufer ALL erkrankten Patienten im Vergleich zu CD19⁺/CD10⁺ Vorläuferzellen im Knochenmark gesunder Spender.

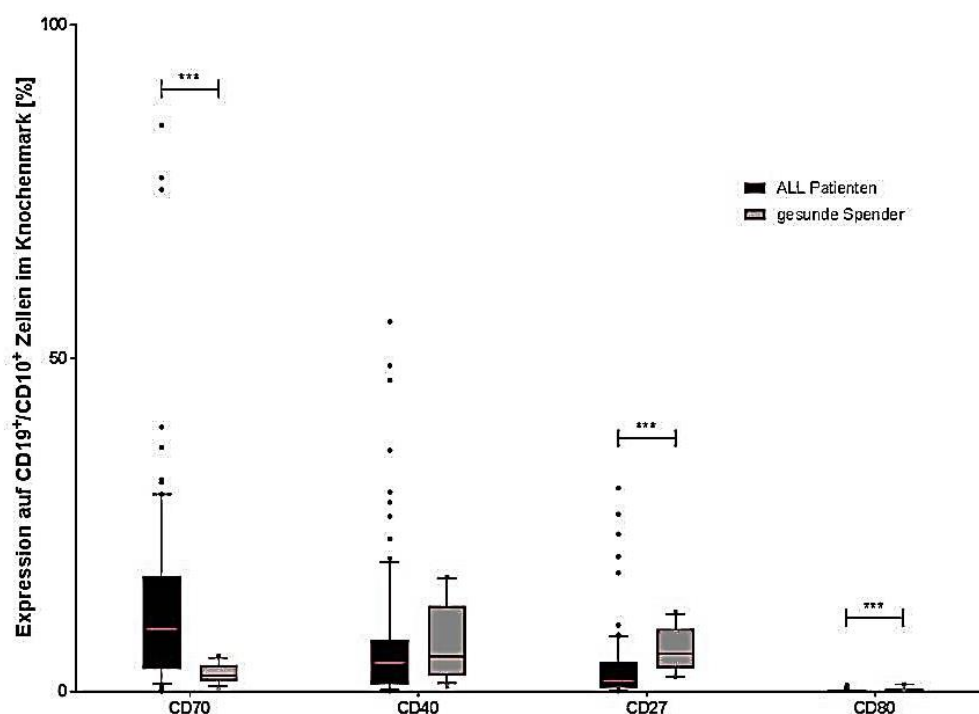


Abbildung 11: Expression ko-stimulatorischer Marker auf CD19⁺/CD10⁺-Blasten/Vorläuferzellen im Knochenmark.

Knochenmark von cALL- und Prä-B-ALL-Patienten sowie gesunden Kontrollspendern wurde hinsichtlich der Oberflächenexpression der ko-stimulatorischen Marker CD70, CD40, CD27 und CD80 auf CD19⁺/CD10⁺ Blasten/Vorläuferzellen durchflusszytometrisch untersucht. Exakte p-Werte wurden mittels Mann-Whitney Test in Prism7 bestimmt. ALL Patienten n= 90, gesunde Spender n= 13.

Die Expression des ko-stimulatorischen Immuncheckpoints CD70 ist auf Blasten der an ALL erkrankten Patienten signifikant höher als in der gesunden Vergleichsgruppe (Mittelwert bei ALL Patienten 13,2 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 2,7 %, p= 0,0004). Die Streuung der CD70-Expression erkrankter Kinder ist höher als die Streuung dieser Expression bei gesunden Kindern. Während sich bei der Expression von CD40 kein signifikanter Unterschied ergibt, ist die Expression von CD27 in ALL Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern signifikant erniedrigt (Mittelwert bei ALL Patienten 3,6 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 6,3 %, p= 0,0003). Die CD80-Expression ist sowohl bei Blasten erkrankter Kinder als auch bei gesunden Probanden sehr niedrig (Mittelwert bei ALL Patienten 0,1 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 0,3 %, p= 0,0001), allerdings in der gesunden Kohorte signifikant höher als bei ALL Patienten.

Die Patientenproben und die Proben gesunder Spender wurden darüber hinaus auf die Oberflächenexpression ko-inhibitorischer Checkpointmoleküle untersucht (Abbildung 12).

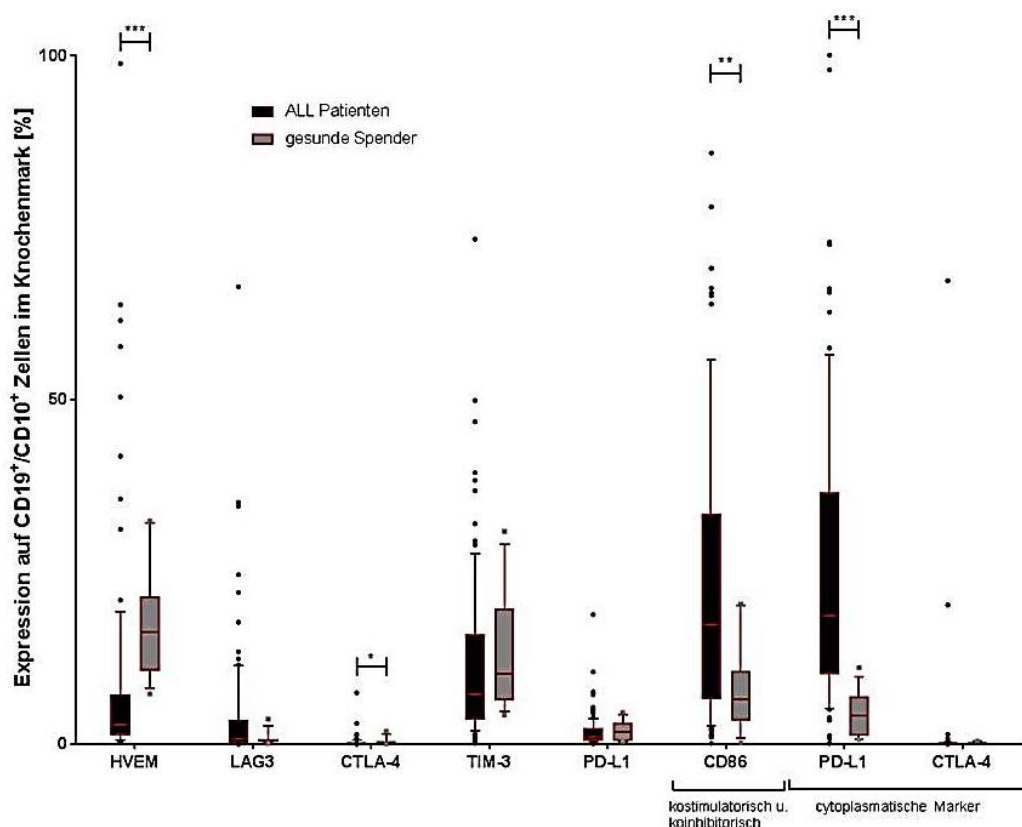


Abbildung 12: Expression ko-inhibitorischer und cytoplasmatischer Marker auf CD19⁺/CD10⁺-Blasten/Vorläuferzellen im Knochenmark.

Knochenmark von cALL- und Prä-B-ALL-Patienten sowie gesunden Kontrollspendern wurde hinsichtlich der Expression ko-inhibitorischer Marker auf CD19⁺/CD10⁺ Blasten/Vorläuferzellen durchflusszytometrisch untersucht. HVEM, LAG3, CTLA-4, TIM-3, PD-L1, sowie der gleichsam ko-stimulatorisch wirkende Marker CD86 wurden auf der Zelloberfläche gefärbt, PD-L1 und CTLA-4 zusätzlich intrazellulär. Exakte p-Werte wurden mittels Mann-Whitney Test in Prism7 bestimmt. ALL Patienten n= 98, gesunde Spender n= 13.

Die durchflusszytometrischen Analysen ergeben, dass der ko-inhibitorische Immuncheckpoint HVEM bei ALL Patienten signifikant geringer exprimiert wird als auf den Blasten gesunder Spender (Mittelwert bei ALL Patienten 8,5 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 17,1 %, $p < 0,0001$). Bei der Expressionshöhe von LAG-3 findet sich kein signifikanter Unterschied. Die Expression von CTLA-4 zeigt trotz im Gesamten niedriger Expression eine signifikant höhere Expression bei gesunden Vorläuferzellen verglichen mit Blasten von ALL Patienten (Mittelwert bei ALL Patienten 0,2 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 0,3 %, $p = 0,0238$). CD86 wird auf Blasten von ALL Patienten signifikant stärker exprimiert als auf der gleichen Zellgruppe von gesunden Spendern (Mittelwert bei ALL Patienten 23,2 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 7,8 %, $p < 0,0001$). Die Expression des extrazellulären PD-L1 ist in beiden Gruppen ähnlich und ohne signifikanten Unterschied zu finden.

Die Expression von cytoplasmatischem CTLA-4 liefert keine signifikanten Unterschiede, während cytoplasmatisches PD-L1 sich in Hinblick auf das Expressionslevel deutlich in beiden Gruppen unterscheidet, was in Abbildung 13 näher beschrieben wird.

4.3 Überexpression von cytoplasmatischem PD-L1 bei ALL Patienten

cALL- und Prä-B-ALLKnochenmarkproben, sowie die Knochenmarkproben der gesunden Spender wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich der Oberflächenexpression und der cytoplasmatischen Expression des ko-inhibitorischen Immuncheckpoints PD-L1 untersucht (Abbildung 13).

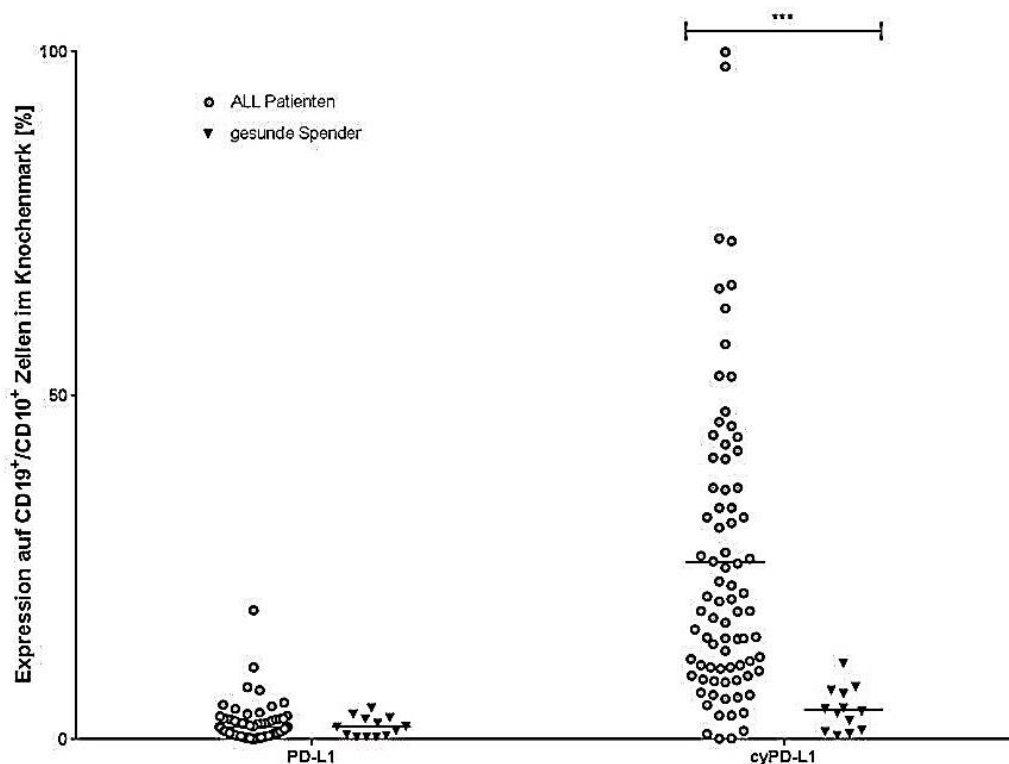


Abbildung 13: Expression von extrazellulärem (PD-L1) und cytoplasmatischem PD-L1 (cyPD-L1) auf CD19⁺/CD10⁺ Blasten/Vorläuferzellen im Knochenmark.

Knochenmark von cALL- und Prä-B-ALL-Patienten sowie gesunden Kontrollspendern wurde hinsichtlich der Expression des ko-inhibitorischen Checkpointmoleküls PD-L1 durchflusszytometrisch untersucht. Waagerechte Balken entsprechen dem Mittelwert. Exakte p-Werte wurden mittels Mann-Whitney Test in Prism7 bestimmt. ALL Patienten n= 98, gesunde Spender n= 13.

Während die Oberflächenexpression von PD-L1 bei fast allen Proben sowohl bei ALL Patienten, als auch bei gesunden Spendern unter 20 % bleibt, zeigt sich bei der cytoplasmatischen PD-L1-Expression ein signifikanter Unterschied. Bei ALL Patienten zeigt

sich die cytoplasmatische PD-L1 Expression weiter gestreut (Range 0,1 % bis 100 %) als bei gesunden Spendern. Um diese Diskrepanz zu veranschaulichen, werden die Werte aus Abbildung 12 in Abbildung 13 erneut aufgearbeitet (Mittelwert ALL Patienten 25,8 %, Mittelwert gesunder Spender 4,3 %, $p < 0,0001$).

4.4 ALL Checkpointexpression unter Simulation einer T-Zellantwort mittels TH1-Stimulus in vitro

In einem weiteren Versuch wurde das Expressionsverhalten der verschiedenen ko-inhibitorischen Checkpoints auf Blasten von an ALL Patienten in Reaktion auf einen künstlichen TH1-Zell-Stimulus untersucht. Nach 40-stündiger Stimulation mit Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) ergibt die erneute durchflusszytometrische Analyse eine Veränderung des Expressionsmusters. Die Expression aller gemessener ko-inhibitorischer Checkpoints ist durch TH1-Stimulation- wenn auch nicht für alle ko-inhibitorischen Moleküle statistisch signifikant- im Trend induzierbar. Für HVEM zeigt sich eine statistisch signifikante Hochregulation (Mittelwert 4,9 % vor Stimulation, Mittelwert 17,8 % nach Stimulation, $p < 0,0001$). Der ko-inhibitorisch und ko-stimulatorisch wirkende Immuncheckpoint CD86 wird durch Stimulation signifikant herunterreguliert (Mittelwert 24,8 % vor Stimulation, Mittelwert 14,6 % nach Stimulation; $p = 0,0059$).

Die Blasten gesunder Spender verändern die Checkpointexpressionen durch Stimulation nicht signifikant, der Trend entspricht dem der leukämischen Blasten (Daten nicht dargestellt).

Es zeigt sich kein Unterschied bezüglich der Stimulierbarkeit bei Patienten mit Rezidiv im Verlauf gegen solche, die kein Rezidiv entwickeln.

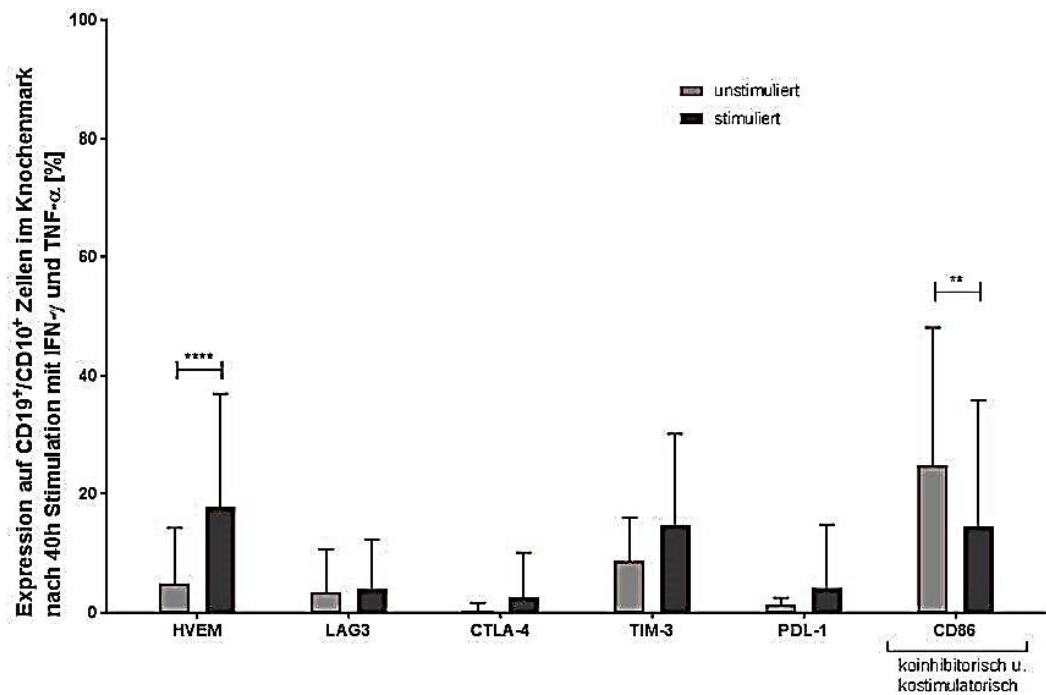


Abbildung 14: Veränderung der Checkpointexpression durch 40-stündige Expression auf Blasten von an ALL erkrankten Kindern.

Blasten aus dem Knochenmark von cALL- und Prä-B-ALL-Patienten wurde 40 Stunden mit IFN- γ und TNF- α inkubiert und sowohl vorher als auch nachher hinsichtlich der Expression der ko-inhibitorischen Checkpointmoleküle HVEM, LAG-3, CTLA-4, TIM-3, PD-L1 und CD86 durchflusszytometrisch untersucht. Exakte p-Werte wurden mittels Mann-Whitney Test in Prism7 bestimmt. ALL Patienten n= 31.

4.5 Signifikante Veränderung der T-Zell-Subpopulationen im Knochenmark von ALL Patienten

Der Anteil CD10⁺/CD19⁺ Zellen und CD3⁺-Zellen unterscheidet sich zwischen den ALL Patienten und gesunden Spendern signifikant. Bei ALL Patienten ist der Anteil der CD10⁺/CD19⁺ Zellen höher als bei gesunden Spendern. Während der Anteil CD3⁺ geringer ausfällt. Abbildung 15 veranschaulicht diese Unterschiede (Mittelwert CD10⁺/CD19⁺ 73,6 % ALL Patienten, Mittelwert CD3⁺ 7,4 % ALL Patienten, Mittelwert CD10⁺/CD19⁺ 11,4 % gesunde Spender, Mittelwert CD3⁺ 27,1 % gesunde Spender; p< 0,0001).

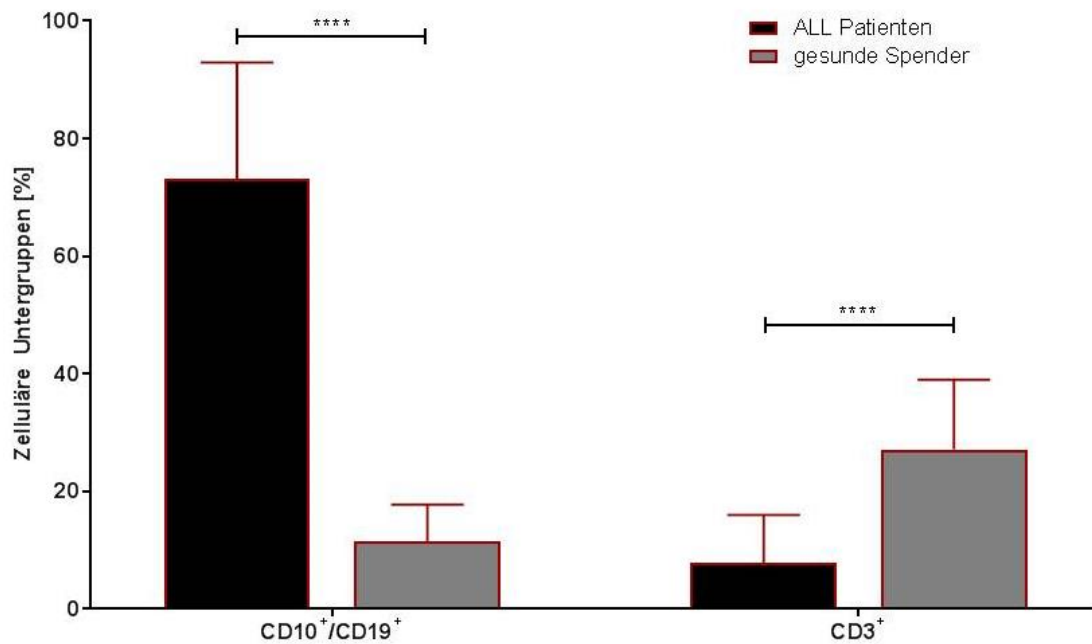


Abbildung 15: Verteilung der Subpopulationen.

In dieser Abbildung wird die unterschiedliche Verteilung der Subpopulationen in Bezug auf die Gesamtzellzahl zwischen ALL Patienten und gesunden Spendern dargestellt. Exakte p-Werte wurden mittels Mann-Whitney Test in Prism7 bestimmt. ALL Patienten CD10⁺/CD19⁺ n= 100, gesunde Spender CD10⁺/CD19⁺ n= 13; ALL Patienten CD3⁺ n= 79, gesunde Spender CD3⁺ n= 12.

Die Knochenmarkproben der cALL- und Prä-B-ALL-Patienten, sowie der gesunden Probanden wurden weiter durchflusszytometrisch hinsichtlich des T-Zell-Subtyps untersucht (Abbildung 16).

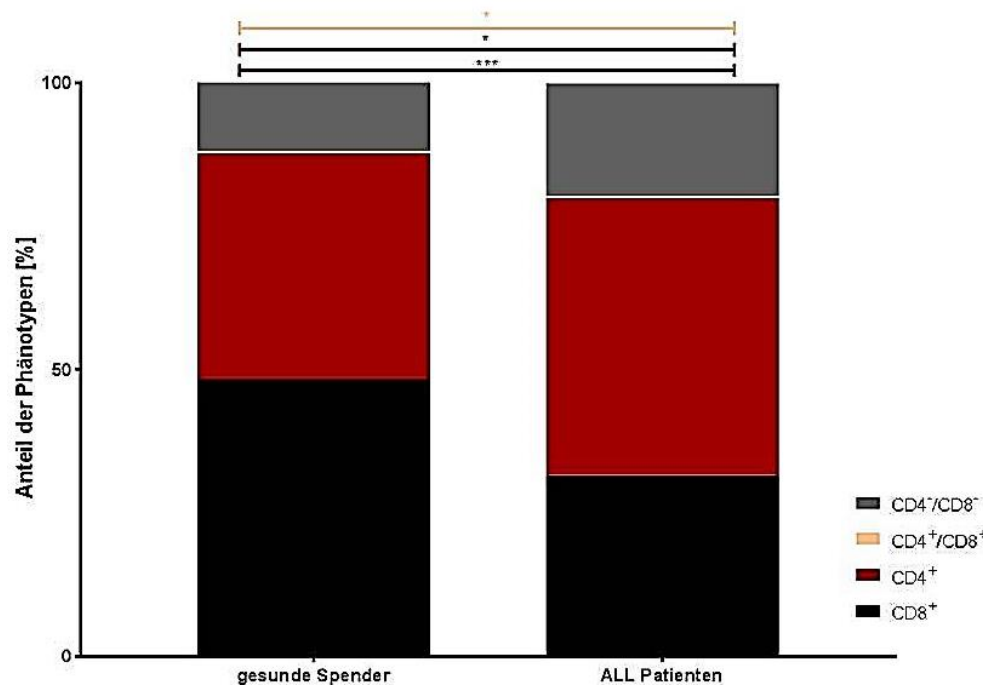


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der CD4- und CD8-Expression auf CD3⁺ T-Zellen im Knochenmark von cALL- und Prä-B-ALL-Patienten sowie gesunden Spendern.

CD3⁺-T-Zellen im Knochenmark von Patienten mit cALL und Prä-B-ALL, sowie von gesunden Kontrollspendern wurden hinsichtlich der Verteilung ihrer T-Zell-Subtypen (CD4⁻/CD8⁻-doppelt-negative T-Zellen, -doppelt-positive T-Zellen und CD4⁻/CD8⁻-einfach positive T-Zellen) durchflusszytometrisch untersucht. Diese Grafik beinhaltet Mittelwerte, welche mit Excel bestimmt wurden. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Mann-Whitney Test. ALL Patienten n= 76, gesunde Spender n= 12.

Patienten mit einer ALL besitzen anteilig signifikant weniger CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen als gesunde Spender (Mittelwert 31,6 % ALL Patienten, 48,2 % bei gesunden Spendern; $p < 0,0001$).

Bei insgesamt niedrigem Anteil CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen in beiden Vergleichsgruppen besitzen Patienten mit ALL einen signifikant geringeren Anteil dieser Population als gesunde Spender (Mittelwert 0,3 % ALL Patienten, 0,38 % bei gesunden Spendern; $p = 0,0384$). Der Anteil CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen ist bei ALL Patienten signifikant höher als bei gesunden Spendern (Mittelwert 48,3 % ALL Patienten, 39,5 % bei gesunden Spendern; $p = 0,0356$), wohingegen sich der Anteil CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻ T-Zellen nicht zwischen den beiden Gruppen unterscheidet. Bei der separaten Betrachtung von cALL und Prä-B-ALL zeigen sich gleichsinnige Veränderungen im Vergleich zu gesunden Spendern, weshalb beide ALL-Formen zusammenfassend betrachtet werden.

In der weiteren Auswertung wurden die T-Zell-Phänotypen der im Knochenmark befindlichen CD3⁺-T-Zellen anhand ihrer CD45RO- und CD62L-Expression näher charakterisiert (Abbildung 17).

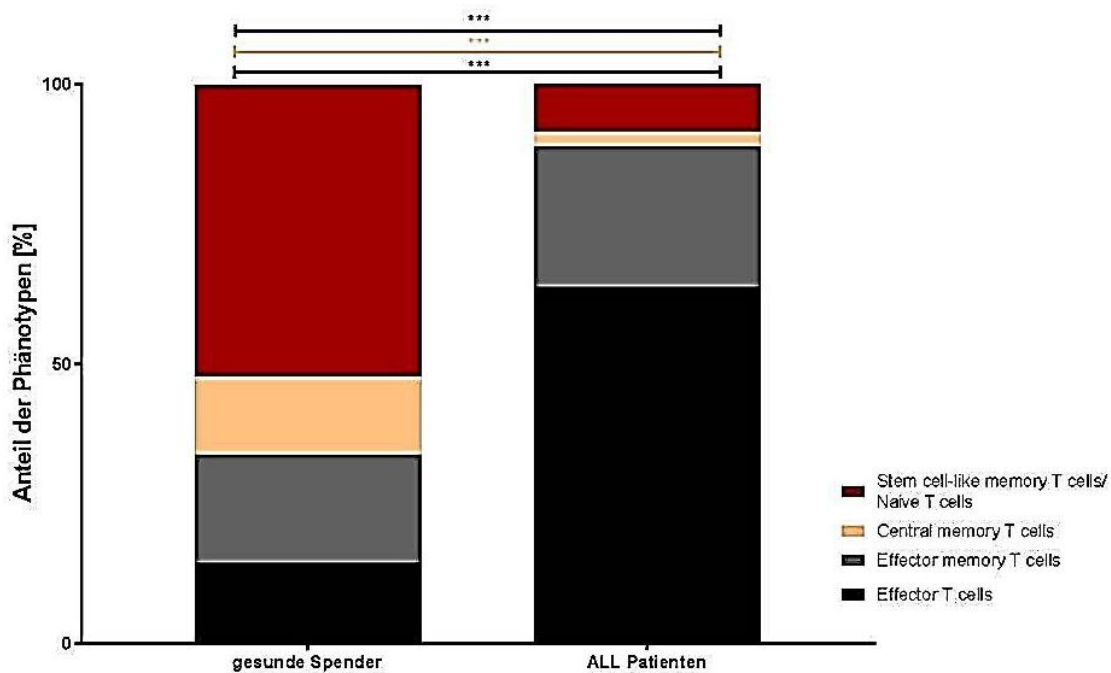


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der T-Zell-Phänotypen auf CD3⁺ T-Zellen im Knochenmark.

CD3⁺ T-Zellen von Patienten mit cALL und Prä-B-ALL, welche als eine Kohorte fungiert, sowie von gesunden Kontrollspendern wurden hinsichtlich der Verteilung ihrer T-Zell Phänotypen durchflusszytometrisch untersucht. Stem cell-like memory T cells/Naive T cells = CD45RO⁻ und CD62L⁺, Central memory T cells = CD45RO⁺ und CD62L⁺, Effector memory T cells = CD45RO⁺ und CD62L⁻ und Effector T cells = CD45RO⁻ und CD62L⁻. Diese Grafik beinhaltet Mittelwerte, welche mit Excel bestimmt wurden. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Mann-Whitney Test. ALL Patienten n= 76, gesunde Spender n= 12.

Die prozentuale Verteilung der T-Zell-Phänotypen unter den CD3⁺ Zellen unterscheidet sich bei ALL Patienten signifikant von der Verteilung bei gesunden Spendern. Patienten mit cALL oder Prä-B-ALL besitzen im Knochenmark einen prozentual signifikant niedrigeren Anteil an Stem cell-like memory T cells/Naive T cells (Tscm/Tn) (Mittelwert 8,4 % ALL Patienten, 52,1 % bei gesunden Spendern; $p < 0,0001$) und Central memory T cells (Mittelwert 2,8 % ALL Patienten, 14,0 % bei gesunden Spendern; $p < 0,0001$) verglichen mit gesunden Spendern. Umgekehrt ist der Anteil von Effector T cells bei gesunden Spendern signifikant niedriger als bei ALL Patienten (Mittelwert 63,8 % ALL Patienten, 14,4 % bei gesunden Spendern; $p < 0,0001$). Für die Population der Effector Memory T cells ergibt sich zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied, dies gilt in gleicher Weise auch für die CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen. Betrachtet man die Gruppe der CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen, so ergibt sich auch für die Effector memory T cells (Tem) ein signifikanter Unterschied. Hier ist der Anteil der Tem bei Patienten mit ALL signifikant höher als bei gesunden Spendern (Mittelwert 29,6 % ALL Patienten, 16,0 % bei gesunden Spendern; $p = 0,0002$).

Abbildung 18 zeigt zudem alle weiteren Unterschiede und Verteilungen binnen dieser zwei Kohorten. Bei cALL- und Prä-B-ALL-Patienten ergaben sich nahezu identische Verteilungen der T-Zell-Phänotypen.

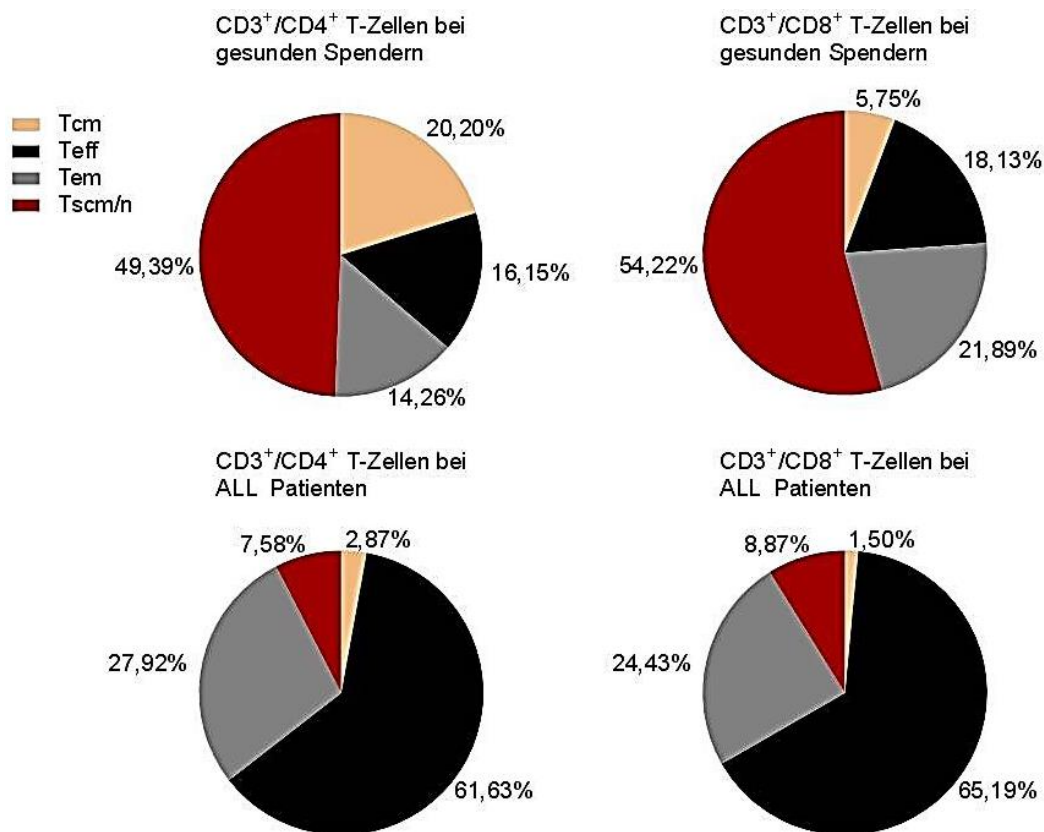


Abbildung 18: Verteilung der T-Zell-Phänotypen der CD3⁺/CD4⁺ sowie CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark von gesunden Spendern und von an cALL oder Prä-B-ALL erkrankten Patienten.

T-Zellen von ALL Patienten, sowie von gesunden Kontrollspendern wurden hinsichtlich der Verteilung ihrer T-Zell Phänotypen in der Untergruppe der CD3⁺/CD4⁺ bzw. CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Tscm/Tn = CD45RO⁻ und CD62L⁺, Tcm = CD45RO⁺ und CD62L⁺, Tem = CD45RO⁺ und CD62L⁻ und Teff = CD45RO⁻ und CD62L⁻. Tortendiagramme zeigen Mittelwerte der einzelnen Subpopulationen, für die Berechnung der Signifikanz wurde ein unpaired t-test verwendet. ALL Patienten n= 76, gesunde Spender n= 12.

Auch in den Untergruppen der CD3⁺/CD4⁺ bzw. CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen zeigen sich die bei der Analyse der CD3⁺ Gesamtpopulation (Abbildung 17) bereits detektierten signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Spendern und ALL Patienten bezüglich des Anteils der Tscm/Tn, Tcm und Teff (Mittelwert CD3⁺/CD4⁺ Tscm/Tn 49,4 %, Tcm 20,2 %, Tem 14,3 %, Teff 16,2 % bei gesunden Spendern und Mittelwert CD3⁺/CD4⁺ Tscm/Tn 7,6 %, Tcm 2,9 %, Tem 27,9 %, Teff 61,6 % bei ALL Patienten; p< 0,0001 für alle Vergleiche, ausgenommen CD3⁺/CD4⁺ Tem gesunde Spender gegen ALL Patienten p= 0,0002; Mittelwert CD3⁺/CD8⁺ Tscm/Tn 54,2 %, Tcm 5,8 %, Tem 21,9 %, Teff 18,1 % bei gesunden Spendern und einem Mittelwert bei CD3⁺/CD8⁺ Tscm/Tn 8,9 % , Tcm 1,5 %, Tem 24,4 %, Teff 65,2 % bei ALL Patienten; p< 0,0001 für alle Vergleiche, ausgenommen CD3⁺/CD8⁺ Tem, ohne signifikanten Unterschied). Eine in der CD3⁺-Gesamtpopulation bislang nicht detektierte, zusätzliche Signifikanz ergibt sich somit beim Tem-Anteil unter den CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen.

Die CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender haben einen signifikant niedrigeren Anteil an Tem verglichen mit CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen von ALL Patienten. Die Signifikanzen wurden in Prism7 mittels eines Mann-Whitney Tests berechnet.

4.6 Die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen bei Diagnosestellung hat keinen Einfluss auf die Rezidivwahrscheinlichkeit

Die Verteilung von CD4⁺ und CD8⁺ auf CD3⁺ T-Zellen im Knochenmark von ALL Patienten wurde hinsichtlich des späteren Auftretens eines Rezidives ausgewertet. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Rezidivwahrscheinlichkeit kann nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es fällt ebenfalls kein Unterschied bezüglich des Rezidivgeschehens zwischen der Ausprägung der Phänotypen auf T-Zellen verschiedener Untergruppen bezüglich CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺ oder CD3⁺/CD8⁺ auf (Abbildung 19).

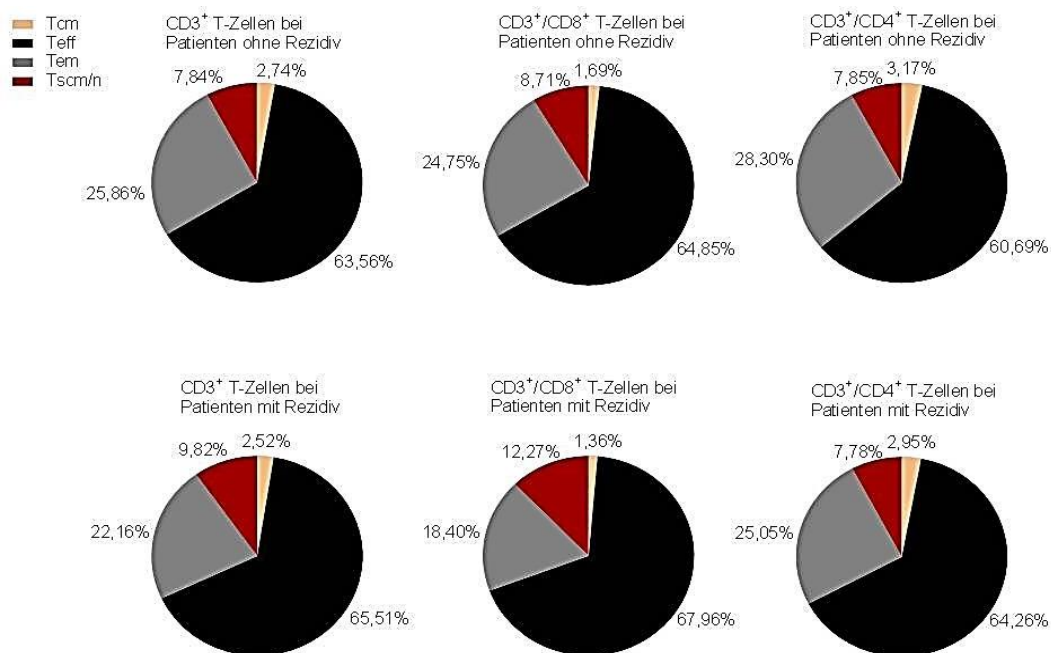


Abbildung 19: Verteilung der phänotypischen Entwicklungsstadien unter CD3⁺, sowie CD3⁺/CD4⁺ und CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen bei Erstdiagnose in Hinblick auf das spätere Auftreten eines Rezidives.

T-Zellen von ALL Patienten mit und ohne Rezidiv im Verlauf wurden hinsichtlich der Verteilung ihrer T-Zell-Phänotypen in der Untergruppe CD3⁺, sowie CD3⁺/CD4⁺ und CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Tscm/Tn = CD45RO⁻ und CD62L⁺, Tcm = CD45RO⁺ und CD62L⁺, Tem = CD45RO⁺ und CD62L⁻ und Teff = CD45RO⁻ und CD62L⁻. Tortendiagramme zeigen Mittelwerte der einzelnen Subpopulationen, für die Berechnung der Signifikanz wurde ein unpaired t-test verwendet. ALL-Patienten n= 76. gesunde Spender n= 12.

4.7 Signifikante Unterschiede in der Expression von Markern der T-Zellerschöpfung im Knochenmark von ALL Patienten und gesunden Probanden

Die T-Zellen im Knochenmark von gesunden Spendern und von an ALL erkrankten Patienten wurden nicht nur hinsichtlich des CD4/CD8-Verhältnisses und des Phänotyps untersucht, sondern darüber hinaus durchflusszytometrisch auf den Expressionsgrad der Exhaustion-Marker PD-1, 2B4 und TIM-3 getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Darstellung der signifikanten Unterschiede auf T-Zellen zwischen gesunden Kindern und ALL Patienten

In rot markiert finden sich die signifikanten Unterschiede. Außerdem ersichtlich ist die Richtung der Signifikanz, deren Ausrichtung sich nach der darüberstehenden Angabe gesund/ALL Patient abhängig von den Ergebnissen richtet. Alle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit n.s. gekennzeichnet, alle signifikanten Unterschiede in rot markiert. Mit (n) markierte Ergebnisse basieren auf einem Expressionsniveau von <5 %.

Untergruppe	3-fach negativ		PD-1		2B4		TIM-3		PD-1/2B4		TIM-3/2B4		TIM-3/PD-1		3-fach positiv	
	gesund	ALL-Patient	gesund	ALL-Patient	gesund	ALL-Patient	gesund	ALL-Patient	gesund	ALL-Patient	gesund	ALL-Patient	gesund	ALL-Patient	gesund	ALL-Patient
CD3+ only	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tscm/Tn	***>		n.s.		**<		n.s.		**<		n.s.		n.s.		n.s.	
Tcm	n.s.		*		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
Tem	*<		n.s.		n.s.		**<		***>		n.s.		n.s.		n.s.	
Teff	**<		n.s.		***>		***<		***>		n.s.		*<		n.s.	
CD3+/CD4+ only	n.s.		n.s.		*<(n)		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
Tscm/Tn	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
Tcm	n.s.		*		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
Tem	*<		***>		n.s.		n.s.		n.s.		*<(n)		n.s.		n.s.	
Teff	***<		*		**>		**<(n)		***>		n.s.		n.s.		n.s.	
CD3+/CD8+ only	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
Tscm/Tn	***>		**<(n)		n.s.		*<		*<(n)		n.s.		n.s.		n.s.	
Tcm	n.s.		*		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
Tem	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
Teff	***<		*		**>		**<(n)		***>		n.s.		n.s.		n.s.	

Die Gruppe der CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen hat tendenziell einen deutlicheren Unterschied zwischen den beiden Kohorten aufzuweisen als CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen. Die Richtung der Unterschiede ist in beiden Gruppen gleich. Da sich die verschiedenen Untergruppen hinsichtlich der Expression der Exhaustion-Marker unterscheiden, sind in Tabelle 8: alle Expressionen und Signifikanzen aufgelistet. Die Population der CD3⁺ Teff wird an dieser Stelle stellvertretend für alle anderen Untersuchungen näher erläutert.

In der Gruppe der ausdifferenzierten Teff (Abbildung 20) ist der Anteil dreifach negativer Zellen bei ALL Patienten signifikant höher als in gesunden Spendern (Mittelwert bei ALL Patienten 74,8 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 57,0 %; $p = 0,0085$). Teff sind im Gegensatz zu den Tscm/Tn bei gesunden Spendern stärker für 2B4 einfach positiv (Mittelwert bei ALL Patienten 7,2 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 19,3 %; $p = 0,0004$) sowie doppelt positiv für PD-1 und 2B4 (Mittelwert bei ALL Patienten 3,9 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 15,3 %; exakter t-test gemäß Prism7 $p < 0,0001$). TIM-3 einfach positive Teff sind in ALL Patienten häufiger zu finden (Mittelwert bei ALL Patienten 7,4 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 1,5 %; $p = 0,0003$), ebenso TIM-3/PD-1 doppelt positive Teff (Mittelwert bei ALL Patienten 2 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 0,8 %, $p = 0,0200$). Die Teff besitzen sowohl bei den ALL Patienten, als auch bei den gesunden Spendern eine geringe Menge an dreifach positiven T-Zellen, die jedoch in ALL Patienten signifikant niedriger ist, als in gesunden Spendern (Mittelwert bei ALL Patienten 0,3 %, Mittelwert bei gesunden Spendern 0,7 %; $p = 0,0069$).

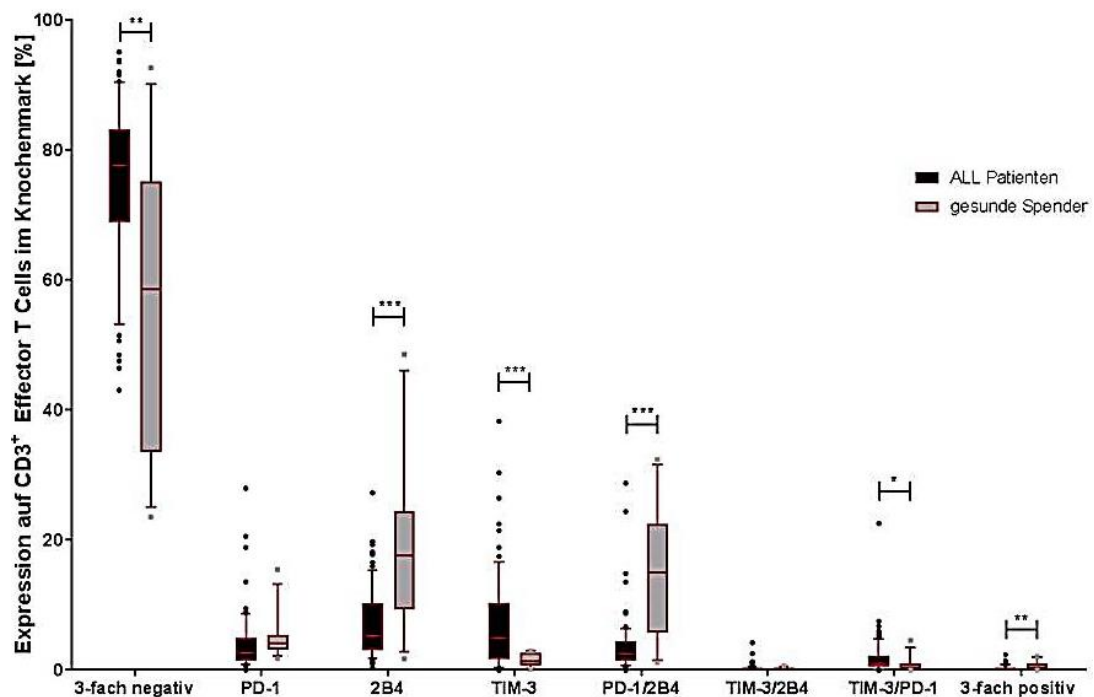


Abbildung 20: Expression der Exhaustion-Marker auf CD3⁺ T-Zellen vom Typ der Effector T cells.

CD3⁺ T-Zellen vom Typ der Teff aus dem Knochenmark von cALL- und Prä-B-ALL-Patienten sowie von gesunden Kontrollspendern wurden hinsichtlich der Oberflächenexpression der Exhaustion Marker PD-1, 2B4 und TIM-3 sowie der Kombination dieser Marker durchflusszytometrisch untersucht. Signifikanztests wurden mittels Mann-Whitney Test durchgeführt. ALL Patienten n= 73, gesunde Spender n= 12.

Um die Signifikanzen auf niedrigem Expressionslevel zu veranschaulichen wird in Abbildung 21 noch einmal die Expression auf CD3⁺ Teff dargestellt.

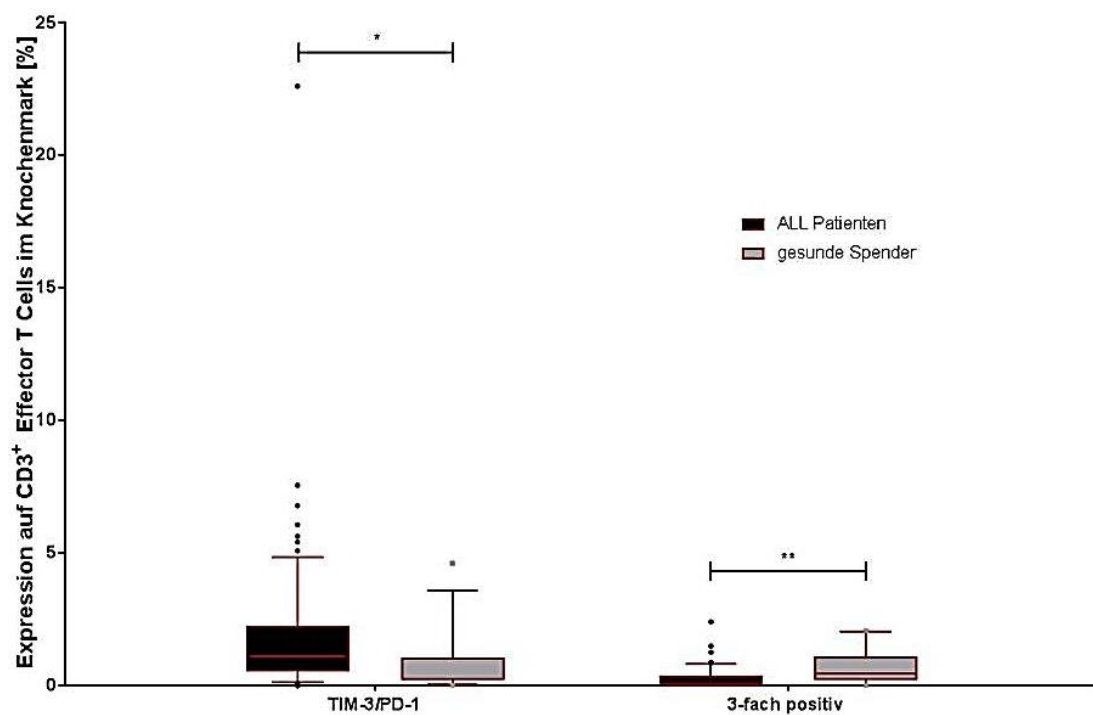


Abbildung 21: Weitere Darstellung der CD3⁺ Effector T cells in Hinblick auf TIM-3/PD-1 doppelt positive und TIM-3/PD-1/2B4 dreifach positive Exhaustion-Marker Expression

4.8 Der ko-inhibitorische und ko-stimulatorische Immunphänotyp der Blasten hat keinen Einfluss auf die Rezidivwahrscheinlichkeit

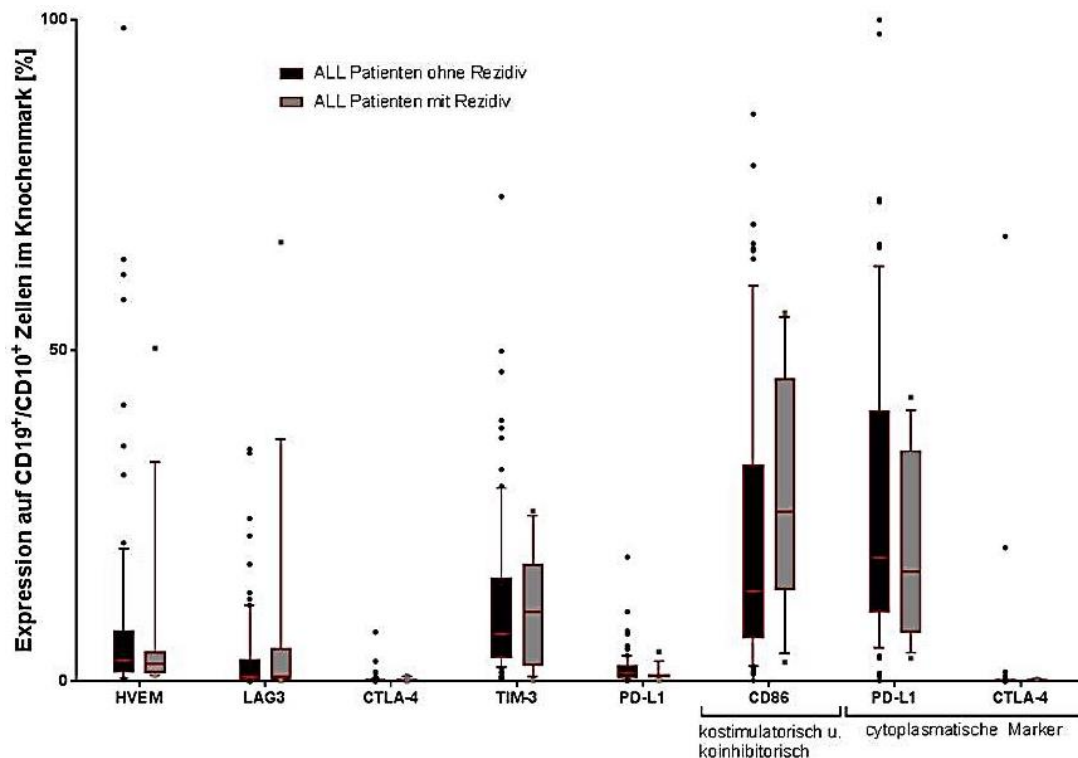


Abbildung 22: Expression ko-inhibitorischer Marker zum Zeitpunkt der Erstdiagnose auf CD19⁺/CD10⁺ Zellen bei ALL Patienten mit Rezidiv im Verlauf, verglichen mit ALL Patienten ohne Rezidiv.

Knochenmark von cALL- und Prä-B-ALL-Patienten mit und ohne Rezidiv im Verlauf wurde hinsichtlich der Oberflächenexpression der ko-inhibitorischer Marker HVEM, LAG3, CTLA-4, TIM-3, PD-L1, sowie des gleichsam ko-stimulatorisch wirkenden Markers CD86 auf CD19⁺/CD10⁺ Blasten/Vorläuferzellen durchflusszytometrisch untersucht. Die Messung von PD-L1 und CTLA-4 erfolgte zusätzlich cytoplasmatisch. Für die Berechnung des Signifikanzniveaus wurde ein t-Test mittels SPSS durchgeführt. ALL Patienten ohne Rezidiv n= 84, ALL Patienten mit Rezidiv n= 14.

Die Expression ko-stimulatorischer und ko-inhibitorischer Immuncheckpoints auf leukämischen Blasten im Knochenmark wurde bei Diagnosestellung untersucht und mit dem späteren Auftreten eines Rezidivs korreliert. Es können weder für die ko-inhibitorischen Marker (HVEM, LAG3, CTLA-4, TIM-3, PD-L1, CD86), noch für die ko-stimulatorischen Marker (CD70, CD40, CD27, CD80, CD86) signifikante Unterschiede detektiert werden zwischen Patienten, die im Verlauf der Erkrankung ein Rezidiv erleiden, und Patienten ohne Rezidiv (Daten zu ko-stimulatorischen Markern nicht gezeigt). Patienten mit ZNS-Rezidiven wurden in der Rezidiv-Gruppe eingeschlossen.

4.9 Patienten mit ALL Rezidiv zeigen schon bei Erstdiagnose eine veränderte Markerexpression der T-Zell-Erschöpfung

Die Expression der Exhaustion-Marker TIM-3, PD-1 und 2B4 auf Knochenmark-T-Zellen bei Erstdiagnose wurde hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz für das Auftreten eines Rezidivs im Verlauf ausgewertet. Beispielhaft für die vielen einzelnen Analysen sind hier einige ausgewählte, aussagekräftige Grafiken zusammengefasst und die übrigen Ergebnisse in Tabelle 9 aufgelistet.

Es finden sich einige signifikante Unterschiede zwischen Kindern, die im Verlauf ein Rezidiv entwickeln zu solchen, die keines entwickeln, bezüglich der Expression von Exhaustion-Markern und deren Kombinationen auf T-Zellen im Knochenmark. Hierbei wurden Patienten mit ZNS-Rezidiven auf die gleiche Art betrachtet wie Patienten mit Rezidiven anderer Lokalisation. Die p-Werte wurden mittels Prism7 durch einen Mann-Whitney Test bestimmt. Die Analyse in Abbildung 23 zeigt, dass Kinder, die kein Rezidiv entwickeln, bei Erstdiagnose einen signifikant höheren Anteil PD-1 einfach positiver CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen besitzen (Mittelwert ALL Patienten ohne Rezidiv 14,4 %, Mittelwert ALL-Patienten mit Rezidiv 8,7 %, $p = 0,0097$). Der Anteil von TIM-3 einfach positiven T-Zellen unterscheidet sich bei dieser Analyse ebenfalls signifikant zwischen den untersuchten beiden Kohorten. Patienten mit Rezidiv im Verlauf zeigen einen größeren Anteil TIM-3 einfach positiver T-Zellen als Kinder ohne Rezidiv im Verlauf (Mittelwert ALL Patienten ohne Rezidiv 10,9 %, Mittelwert ALL Patienten mit Rezidiv 17,5 %, $p = 0,0479$). Der Anteil TIM-3/2B4 doppelt positiver CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen stellt sich in Patienten mit Rezidiv im Verlauf größer dar als bei Patienten, die rezidivfrei verbleiben (TIM-3/2B4: Mittelwert ALL Patienten ohne Rezidiv 0,1 %, Mittelwert ALL Patienten mit Rezidiv 1 %, $p = 0,0171$). Die übrigen Konstellationen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

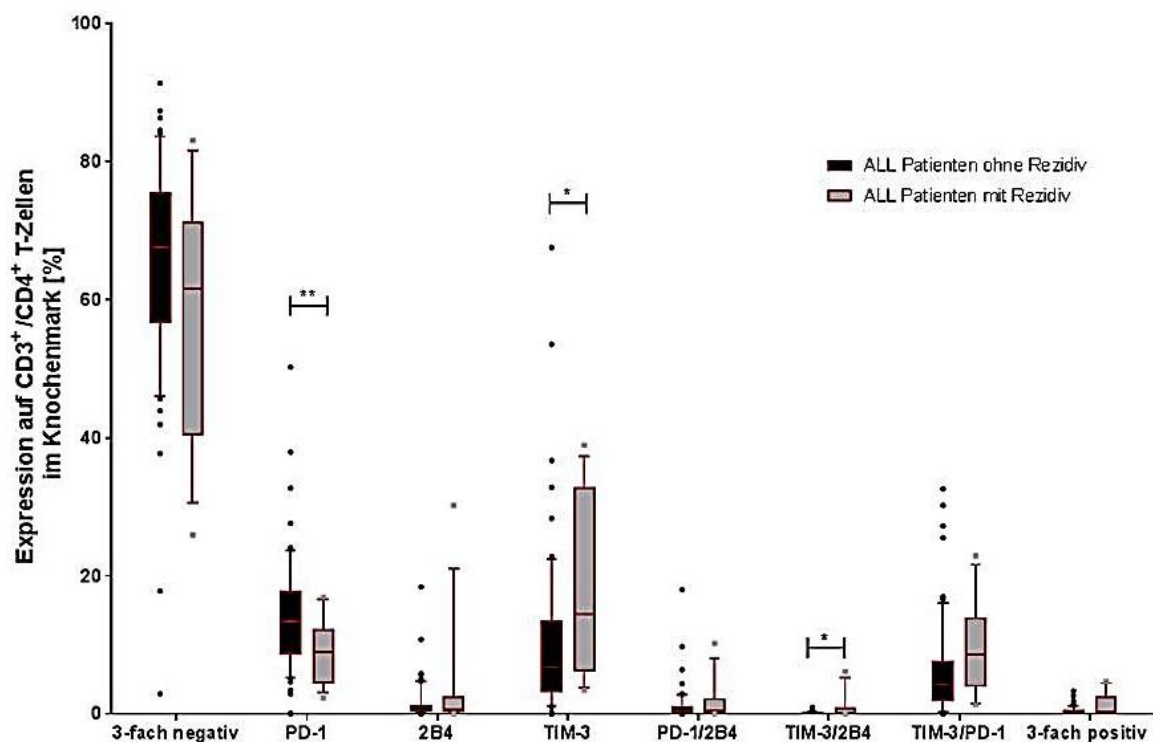


Abbildung 23: Exhaustion-Marker Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark bei Erstdiagnose und Korrelation zu dem Auftreten eines Rezidives im Verlauf

Knochenmark von cALL- und Prä-B-ALL-Patienten mit und ohne Rezidiv im Verlauf wurde hinsichtlich der Oberflächenexpression von Exhaustion-Markern auf T-Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Für die Berechnung des Signifikanzniveaus wurde ein Mann-Whitney Test verwendet. ALL Patienten ohne Rezidiv n= 61, ALL Patienten mit Rezidiv n= 13.

Betrachtet man die TIM-3 overall Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen, ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Rezidiv und ohne Rezidiv, der in Abbildung 24 dargestellt ist (TIM-3 overall calculation: Mittelwert ALL Patienten ohne Rezidiv 17,9 %, Mittelwert ALL Patienten mit Rezidiv 29,1 % p= 0,0143).

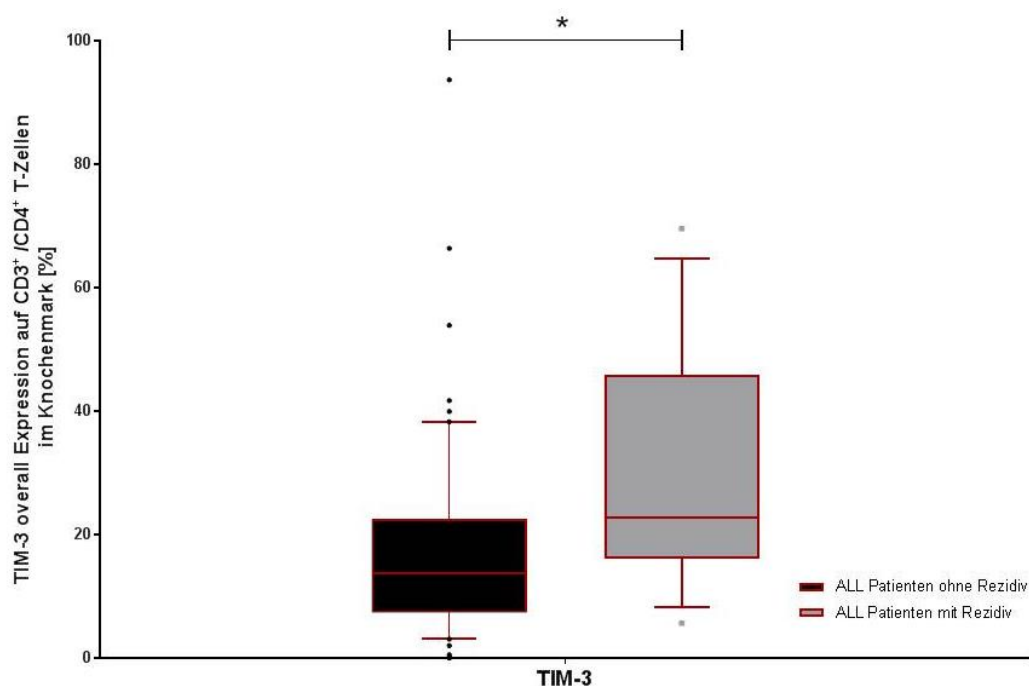


Abbildung 24: TIM-3 overall Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen

Knochenmark von cALL und Prä-B-ALL Patienten mit und ohne Rezidiv im Verlauf wurde hinsichtlich der Oberflächenexpression von Exhaustion-Markern auf T-Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Diese Darstellung beschränkt sich auf die TIM-3 overall Expression. Für die Berechnung der Signifikanz wurde ein Mann-Whitney Test verwendet. ALL Patienten ohne Rezidiv n= 61, ALL Patienten mit Rezidiv n= 13

Zugunsten der Übersicht wird auf die Darstellung weiterer Untergruppen verzichtet und auf Tabelle 9 verwiesen.

Tabelle 9: Übersicht über die geprüften Exhaustion-Marker Kombinationen auf verschiedenen T-Zell Subpopulationen von Patienten mit und ohne Rezidiv im Verlauf. Mit (n) markierte Ergebnisse basieren auf einem Expressionsniveau von <5 %.

Untergruppe	3-fach negativ		PD-1		2B4		TIM-3		PD-1/2B4		TIM-3/2B4		TIM-3/PD-1		3-fach positiv	
	kein	Rezidiv	kein	Rezidiv	kein	Rezidiv	kein	Rezidiv	kein	Rezidiv	kein	Rezidiv	kein	Rezidiv	kein	Rezidiv
CD3 ⁺ only	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*>	n.s.	n.s.	n.s.	*>	n.s.
Tscm/Tn	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*>	n.s.	n.s.	n.s.
Tcm	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tem	n.s.	n.s.	**<	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**>(n)	n.s.	n.s.	n.s.	**>	n.s.
Teff	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*>(n)	n.s.	n.s.	*>(n)	n.s.
CD3 ⁺ , CD4 ⁺ only	n.s.	n.s.	*<	n.s.	n.s.	n.s.	*>	n.s.	n.s.	n.s.	*>(n)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tscm/Tn	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*>	n.s.	n.s.	n.s.
Tcm	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tem	n.s.	n.s.	*<	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*>	n.s.
Teff	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*>(n)	n.s.	*>(n)	n.s.
CD3 ⁺ , CD8 ⁺ only	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tscm/Tn	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tcm	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tem	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Teff	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*>(n)	n.s.

4.10 Patienten mit hoher Frequenz TIM-3⁺ und TIM3⁺/PD1⁺ Knochenmark-T-Zellen haben ein signifikant höheres Rezidivrisiko

Die statistischen Auswertungen zeigen, dass Patienten mit einem Rezidiv im Verlauf bereits bei Erstdiagnose erhöhte TIM-3⁺ CD3⁺/CD4⁺ Knochenmark-T-Zellen aufweisen im Vergleich zu Patienten ohne Rezidiv. Dies gilt sowohl in der Subgruppe der CD3⁺/CD4⁺ Teff, als auch in der Kohorte der gesamten CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen ($p=0,0204$). Die Kaplan Meier Kurve für die Untergruppe der CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen ist in Abbildung 25 dargestellt (TIM-3 high >14 %, TIM-3 low ≤ 14 %). In der Subpopulation der CD3⁺/CD8⁺ Zellen ist kein signifikanter Unterschied in der TIM-3-Expression detektierbar.

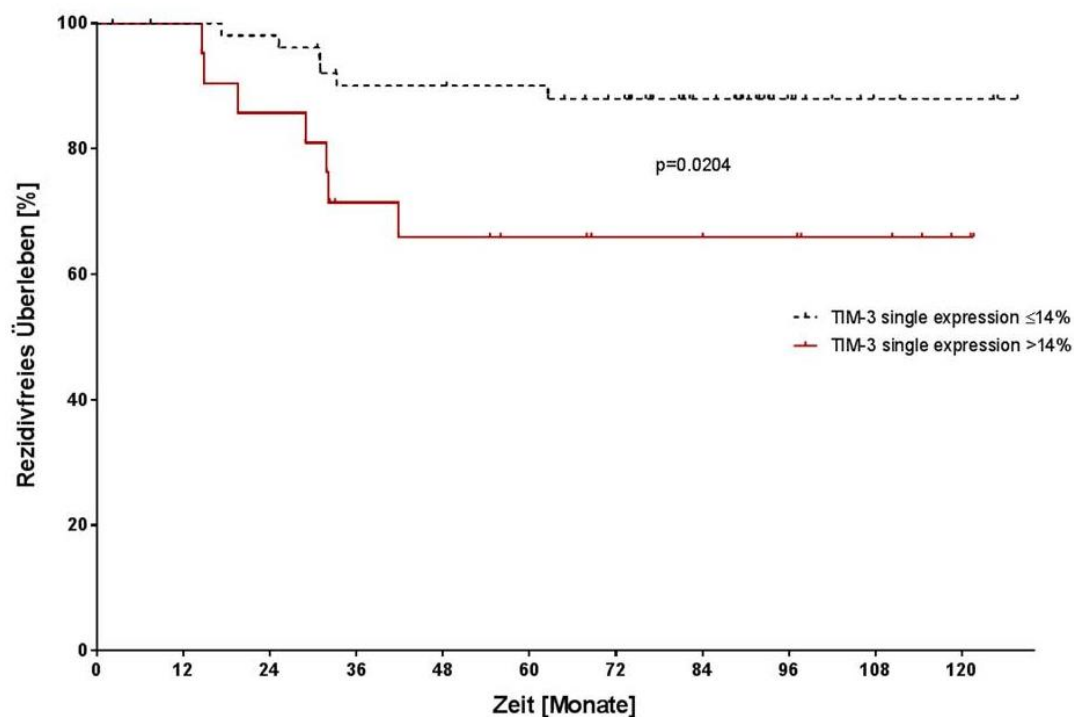


Abbildung 25: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von TIM-3⁺ CD3⁺/CD4⁺ Knochenmark-T-Zellen bei Erstdiagnose

Knochenmark von Patienten mit einer cALL oder einer Prä-B-ALL wurde auf extrazelluläre Expression von TIM-3 auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen untersucht und mit dem rezidivfreien Überleben korreliert. TIM-3 high= TIM-3⁺ T-Zellen >14 %, n= 21. TIM-3 low= TIM-3⁺ T-Zellen ≤ 14 %, n= 53. Für die Berechnung der Signifikanz wurde der Log-Rank-Test verwendet.

Tabelle 10: TIM-3-Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark vs. Auftreten eines Rezidivs im Verlauf der Erkrankung

	Rezidiv	Kein Rezidiv	
TIM-3 high	n=7	n=14	33% (Pos-Präd. Wert)
TIM-3 low	n=6	n=47	89% (Neg-Präd. Wert)
	54% (Sensitivität)	77% (Spezifität)	

Die Vierfeldertafel (Tabelle 10) zeigt mit einem positiv prädiktiven Wert von 33 %, dass Patienten mit hoher TIM-3⁺ CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen häufiger ein Rezidiv erlitten, wohingegen bei niedriger TIM-3⁺ Zellen ein negativ prädiktiver Wert von 89 % dafür spricht, dass die Patienten häufiger kein Rezidiv erlitten.

Betrachtet man die Expression von TIM-3 auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen in Form einer overall calculation, in der die Expression der anderen Exhaustion-Marker keine Rolle spielt, so ergibt sich in Korrelation mit dem Rezidivaufreten ebenfalls ein signifikanter Unterschied, $p=0,007$ (Abbildung 26). Patienten mit einer hohen TIM-3 Expression bei ED (>16 %) erleiden signifikant häufiger ein Rezidiv im Krankheitsverlauf, verglichen mit Patienten, die eine niedrige TIM-3 Expression aufweisen (≤ 16 %). Die multivariate Analyse (COX-Regression), die die bislang verwendeten prognostischen Marker MRD, WBC und Alter einschloss, bestätigte ein 7,2-fach erhöhtes Rezidivrisiko für Patienten mit hoher TIM-3 Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark.

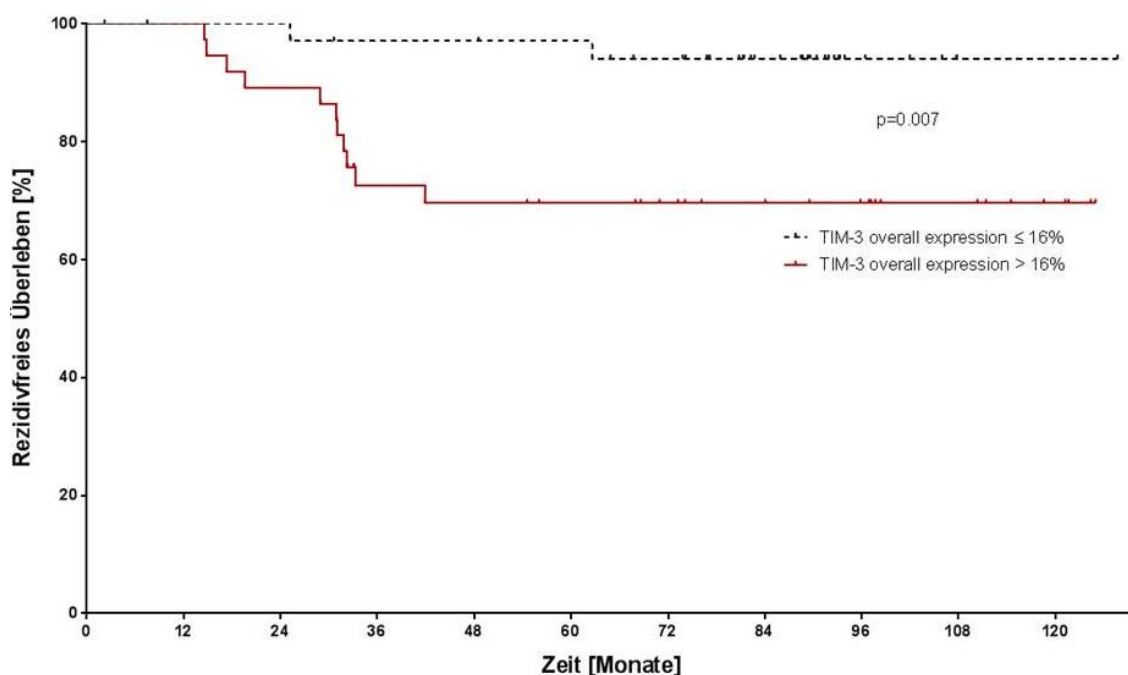


Abbildung 26: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der Frequenz TIM-3⁺ CD3⁺/CD4⁺ Knochenmark-T-Zellen bei Erstdiagnose.

Knochenmark von Patienten mit einer cALL oder einer Prä-B-ALL wurde auf extrazelluläre Expression von TIM-3 auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen untersucht und mit dem rezidivfreien Überleben korreliert. TIM-3 high = TIM-3⁺ T-Zellen >16 %, n= 38. TIM-3 low = TIM-3⁺ T-Zellen ≤16 %, n= 37. Für die Berechnung der Signifikanz wurde der Log-Rank-Test verwendet.

Aus der Beobachtung, dass eine Expression von TIM-3 auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen mit dem Rezidivaufreten korreliert, ergibt sich folgende Vierfeldertafel, die in Tabelle 11 dargestellt ist. Hierbei wird deutlich, dass 30 % der Patienten mit hoher TIM-3 overall Expression im Verlauf ein Rezidiv entwickeln. Hingegen ist die Häufigkeit kein Rezidiv zu entwickeln bei niedriger TIM-3 overall Expression in unserer Kohorte bei 95 %.

Die Sensitivität liegt bei 85 % und die Spezifität bei 59 %.

Tabelle 11: Vierfeldertafel der overall TIM-3-Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark bezüglich Auftreten eines Rezidives im Verlauf der Erkrankung

	Rezidiv	Kein Rezidiv	
TIM-3 high	11	26	30% (Pos-Präd. Wert)
TIM-3 low	2	37	95% (Neg-Präd. Wert)
	85% (Sensitivität)	59% (Spezifität)	

Die Betrachtung der TIM-3/PD-1 Doppelexpression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen zeigt ebenfalls signifikante Unterschiede. Bei Festlegung eines Cut-Offs auf $\leq 8\%$ ergeben sich zwei Gruppen, die sich signifikant in ihrer Rezidiventwicklung unterscheiden ($p = 0,0026$). Patienten mit $>8\%$ TIM-3/PD-1 doppelt-positiven T-Zellen bei Erstdiagnose gehören der „TIM-3/PD-1 high“-Gruppe an und erlitten signifikant häufiger ein Rezidiv im Verlauf als Patienten mit einem Prozentsatz $\leq 8\%$ für TIM-3/PD-1 doppelt-positiven Zellen, die der „TIM-3/PD-1 low“-Gruppe angehören.

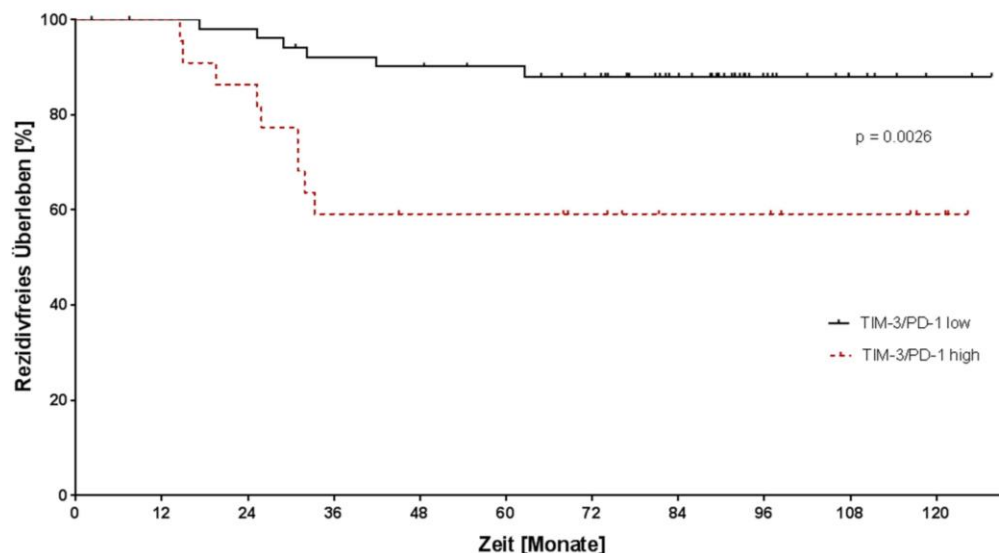


Abbildung 27: Rezidivfreies Überleben bei CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen mit unterschiedlichem Anteil TIM3⁺/PD-1⁺ Zellen

Knochenmark von Patienten mit einer cALL oder einer Prä-B-ALL wurde aufgrund der durchflusszytometrisch geprüften extrazellulären Doppelexpression von TIM-3/PD-1 auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen in eine Gruppe mit hohem TIM-3/PD-1-Level (TIM-3/PD-1 Expression $>8\%$) und eine Gruppe mit niedrigem TIM-3/PD-1-Level (TIM-3/PD-1 Expression $\leq 8\%$) eingeteilt. Darauf wurde das Follow-Up der Patienten betrachtet und eine Korrelation zwischen Rezidivaufreten und TIM-3/PD-1 Doppelexpressionshöhe mittels Kaplan-Meier Kurve geprüft. Für die Berechnung der Signifikanz wurde der Log-Rank-Test verwendet. TIM-3/PD-1 low $n = 53$, TIM-3/PD-1 high $n = 22$.

Auch diese Werte wurden mittels Vierfeldertafel in Hinblick auf potenzielle Unterschiede analysiert.

Tabelle 12: Vierfeldertafel zur Analyse der Vorhersagekraft eines hohen Anteils TIM3⁺/PD-1⁺ doppelt positiver Zellen von allen CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark der Patienten

	Rezidiv	Kein Rezidiv	
TIM-3 ⁺ /PD-1 ⁺ high	9	13	41% (Pos-Präd. Wert)
TIM-3 ⁺ /PD-1 ⁺ low	6	47	89% (Neg-Präd. Wert)
	60% (Sensitivität)	78% (Spezifität)	

Hier ergibt sich durch ein Expressionslevel von >8 % TIM-3/PD-1 doppelt-positiver T-Zellen ein positiver Vorhersagewert für ein Rezidiv von 41 %, welcher im Kontrast zu 11 % Vorhersagewahrscheinlichkeit für ein Rezidiv, bei Patienten mit einem Anteil TIM-3/PD-1 doppelt-positiver T-Zellen ≤8 % steht.

4.11 Die Checkpointexpression auf Leukämiezellen und Expression der Exhaustion-Marker auf T-Zellen zeigen keinen Zusammenhang mit dem MRD-Level oder Therapieansprechen

Die Expression der ko-inhibitorischen bzw. ko-stimulatorischen Immuncheckpoints sowie der T-Zell-Exhaustion-Marker wurden hinsichtlich ihrer Relevanz für das Therapieansprechen (CCR vs. LR an Tag 29) und das MRD-Level an Tag 29 (MRD ≥10⁻³ vs. <10⁻³) untersucht. Die Ergebnisse liefern keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht dargestellt).

4.12 Weitere Expression von immunmodulatorischen Molekülen im Knochenmark

In weiteren statistischen Analysen wurden verschiedene Untergruppen hinsichtlich signifikanter Unterschiede in der Checkpointexpression und Expression der Exhaustion-Marker untersucht. Weder das Alter bei Diagnosestellung (<10 vs. ≥10 Jahre) noch das Alter beim Auftreten eines Rezidives oder die Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidives (<18 Monate nach ED oder ≥18 Monate nach ED) liefern signifikante Unterschiede der Expression von Checkpoints oder Exhaustion-Markern (Daten nicht dargestellt).

Bei der Auswertung der Immuncheckpointmoleküle hinsichtlich eines Unterschieds zwischen den beiden Geschlechtern, ergibt sich bei gesunden Spendern eine signifikant höhere Expression von HVEM bei Jungen (Abbildung 28).

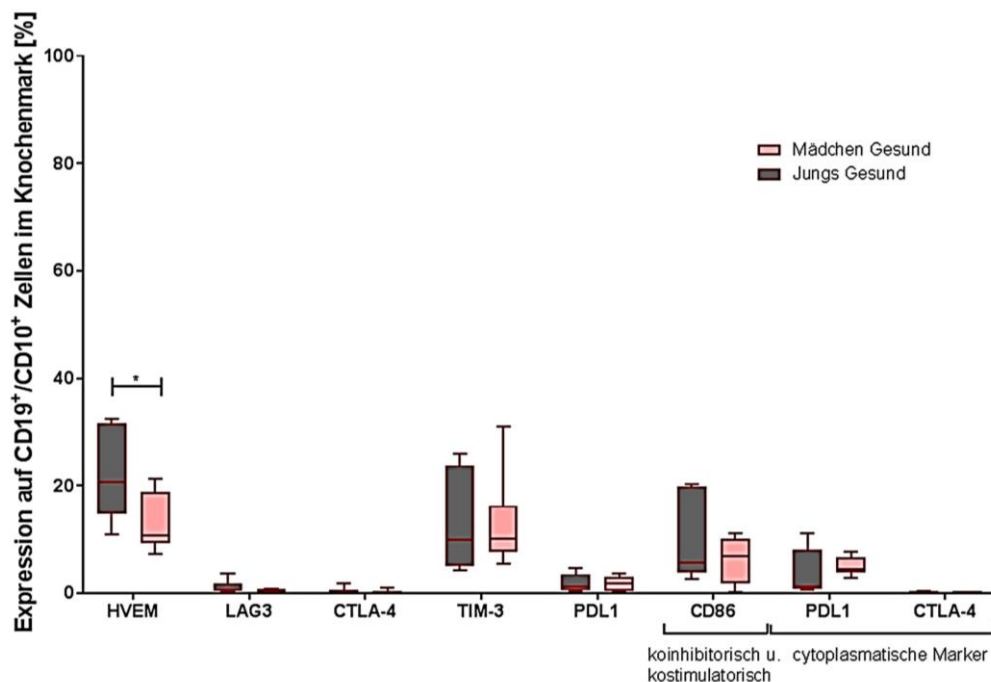


Abbildung 28: Expression ko-inhibitorischer Marker auf CD19⁺/CD10⁺ Zellen von gesunden Spendern in Hinblick auf den Geschlechterunterschied

Knochenmark von gesunden Spendern beider Geschlechter wurde hinsichtlich der Oberflächenexpression der ko-inhibitorischer Marker HVEM, LAG3, CTLA-4, TIM-3, PD-L1, sowie des gleichsam ko-stimulatorisch wirkenden Markers CD86 auf der Zelloberfläche gefärbt, und PD-L1 und CTLA-4 zusätzlich intrazellulär, auf CD19⁺/CD10⁺ Blasten/Vorläuferzellen durchflusszytometrisch untersucht. Für die Berechnung der Signifikanz wurde ein Mann-Whitney Test verwendet. (Mädchen n= 7, Jungen n= 6)

Mädchen zeigen in der Kohorte der gesunden Probanden eine signifikant niedrigere HVEM-Expression als Jungen (Mittelwert Mädchen 22,1 %, Mittelwert Jungen 12,8 %, p= 0,0350). Dieser Unterschied lässt sich bei an ALL erkrankten Patienten nicht bestätigen.

Für alle weiteren ko-inhibitorischen und ko-stimulatorischen Oberflächenmarker sowie für die T-Zell-Exhaustion-Marker ergaben sich zwischen den Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede.

4.13 Immunfluoreszenzfärbung von PD-L1 auf Blasten

Um die durchflusszytometrischen PD-L1-Messungen anhand einer zweiten unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenzversuche durchgeführt. Obwohl die Färbung von Positivkontrollen mit CD19, CD10 und PD-L1 gelang, war die Qualität und Aufarbeitung der Patientenproben bei mangelnder Vereinzelung der Patientenzellen auf dem Objektträger nicht ausreichend, um diese Methode als Bestätigung der PD-L1-Messungen heranzuziehen (Abbildung 29).

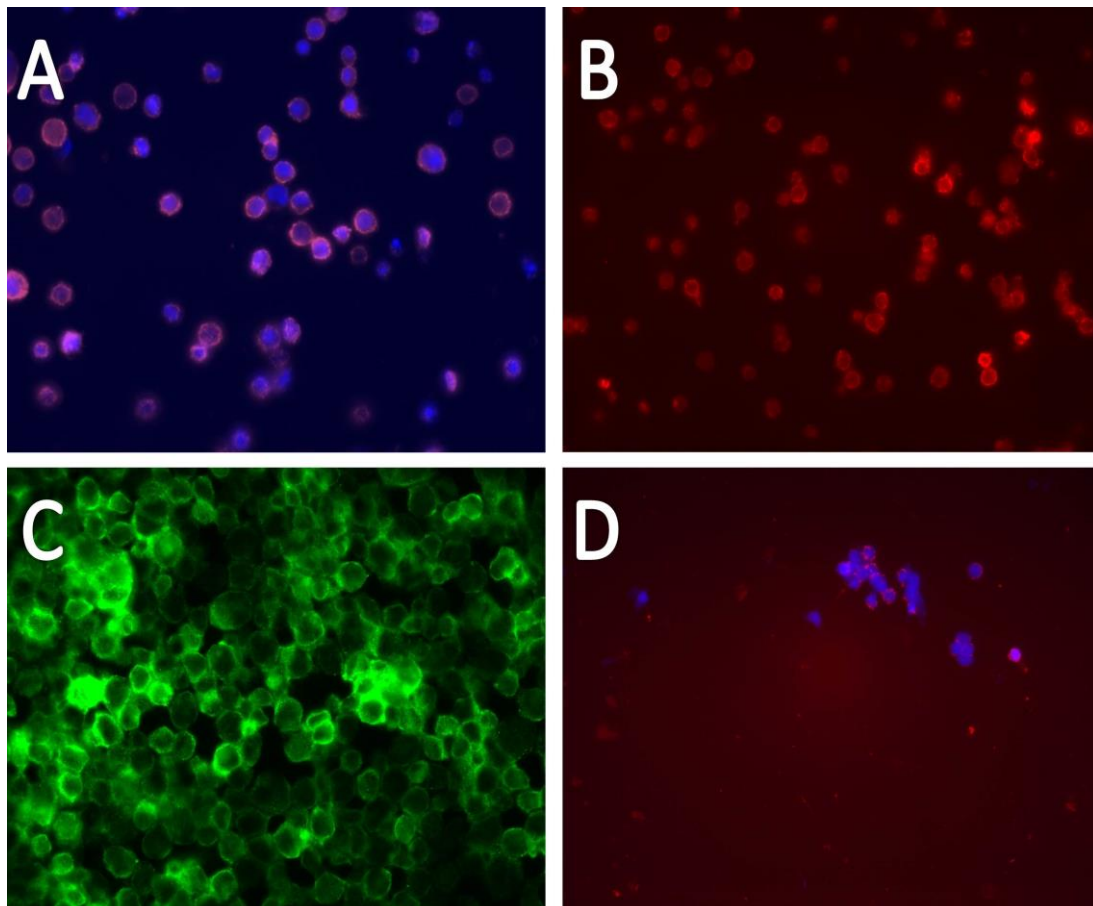


Abbildung 29: Etablierung einer Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenzfärbungen wurden durchgeführt mit (A) CD19 auf Rajis (violett), (B) CD10 auf Rajis (rot), (C) PD-L1 extrazellulär auf THP-1 Zellen (grün) und (D) CD19 (violett) und extrazelluläres PD-L1 (grün) auf einer Patientenprobe, die mittels Zytospin auf dem Objektträger fixiert wurde. Alle Zellen wurden zusätzlich mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) gefärbt.

5 Diskussion

5.1 Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit stellt erstmalig durch die systematische Analyse einer großen Patientenkohorte die Veränderung der Checkpointexpression im Knochenmark bei akuter lymphoblastischer Leukämie im Kindesalter dar. Sie beinhaltet die Expression von Immuncheckpoints sowohl auf T-Zellen als auch auf Blasten und die Expressionsveränderung verschiedener Checkpoints nach in vitro TH-1-Stimulus. Diese Arbeit liefert die Grundlage für weitere Untersuchungen der T-Zell/Blasten-Interaktion bei B-Vorläufer ALL auf Basis der ko-stimulatorischen und ko-inhibitorischen Moleküle. Das Bestreben liegt in der Detektion neuer Therapieoptionen und Prognoseparameter. Für Patienten mit bislang schlechter Prognose könnten sich hieraus neue Therapieoptionen ergeben.

5.2 Wichtigste Erkenntnisse unserer Analysen

5.2.1 Vergleich der ko-inhibitorischen Checkpointexpression auf Blastenseite zwischen gesunden Kindern und Kindern mit B-Vorläufer ALL

Bei der Analyse ausgewählter ko-inhibitorischer Checkpoints fallen wenige signifikante Unterschiede zwischen den Blasten gesunder Probanden und den Blasten von ALL Patienten auf. Kofaktoren, wie das Alter oder Geschlecht der Patienten, machen keinen Unterschied für die Expression. Die Streuung aller ko-inhibitorischen Checkpoints HVEM, LAG-3, TIM-3, PD-L1 und CD86 ist auf den Blasten kranker Kinder wesentlich größer als bei Gesunden, dies deckt sich mit den Vordaten.[36] Diese Streuung könnte ein Hinweis auf den beginnenden Anstieg der Expression ko-inhibitorischer Checkpoints auf Leukämiezellen sein, der im Verlauf den Immune Escape Mechanismus fördert, jedoch durch die Analyse der Erstdiagnoseproben noch nicht zu erkennen ist. Um diese Hypothese zu prüfen, müssten Knochenmarkproben derselben Patienten aus dem späteren Krankheitsverlauf auf dieselben Checkpoints untersucht werden. Diese Proben lagen uns nicht vor, weshalb wir keine späteren Zeitpunkte der Erkrankung analysieren konnten.

Der Median einzelner Checkpointexpressionen konnte die Vordaten von *Feucht et al.* nicht vollständig bestätigen, in denen alle ko-inhibitorischen Checkpoints auf ALL-Blasten im Median höher zu finden sind als auf den Zellen gesunder Spender.[36] In unseren Ergebnissen sind HVEM, TIM-3 und PD-L1 auf der Oberfläche gesunder Blasten im Median

höher exprimiert als auf ALL-Blasten. HVEM stellt sich hier zwar auch auf ALL-Blasten als weiter gestreut dar, jedoch befindet sich der Median kranker Patienten deutlich unter dem der gesunden Vergleichskohorte. TIM-3 zeigt in diesen Vordaten ein sehr viel geringeres Expressionsniveau von <10 % auf gesunden und ALL-Blasten, während unsere Versuche eine Streuung der Expression auf ALL-Blasten von bis zu 70 % aufweisen, bei ähnlichen Werten für den Median. Die Tendenz für einen höheren Median der Expression von TIM-3 auf gesunden Blasten können wir trotz der großen Streuung der Expression auf kranken Blasten bestätigen.

Die signifikante Mehrexpression von HVEM und TIM-3 bei Gesunden zeigt, dass es für die ALL nicht zutrifft, dass eine Hochregulation ko-inhibitorischer Checkpoints auf Tumorzellen den Immune Escape fördert.[60] Für HVEM, dessen Hauptwirkung bislang in der Interaktion mit BTLA auf Tumorzellen als antiinflammatorisch und damit ko-inhibitorisch zu werten ist, könnte das von uns detektierte niedrige Expressionslevel auf ALL-Blasten entweder für eine ko-stimulatorische, proinflammatorische Interaktion mit einem anderen Liganden, wie LIGHT, oder eine im Zeitpunkt der Probenentnahme begründete, noch nicht auf allen Blasten hochregulierte HVEM-Expression mit im Median noch höheren Werten bei gesunden Blasten sprechen.[61] Letztere Vermutung wird durch die sehr verschiedenen Expressionslevel mit teils sehr viel höherer HVEM-Expression auf ALL-Blasten mit bis zu knapp 100 % unterstützt. Um den hier vorrangigen Signalweg zu detektieren, wäre eine weitere funktionelle Analyse notwendig.

TIM-3-Expression ist bisher größtenteils auf T-Zellseite beschrieben.[57] *Das et al.* beschreibt allerdings auch eine suppressive Wirkung von TIM-3 auf DCs sowie anderen Zellen des angeborenen Immunsystems. Ob diese Funktion auf Blastenseite ebenfalls in diese Richtung geht, konnten wir nicht testen. Auffallend ist, dass TIM-3 auch auf Blastenseite exprimiert wird und im Median sogar auf gesunden Zellen stärker als auf ALL-Blasten.

Die Expression von CD86 unterstützt die Ergebnisse aus der kleinen Kohorte. Es wird auf leukämischen Blasten sowohl mit einem größeren Spektrum gestreut, als auch insgesamt im Median höher exprimiert als auf Blasten gesunder Spender.[36] CD86 hat bei Interaktion mit CD28 eine ko-stimulatorische Funktion, sowie bei der Interaktion mit CTLA-4 ko-inhibitorische Funktion. Aufgrund der stärkeren Affinität zu CTLA-4 passt in diesem Fall die Vermutung, dass sich die Leukämiezelle mittels Expression von CD86 die ko-inhibitorischen Funktionen zunutze macht und somit die Entwicklung der Leukämie unterstützt wird.[62] Eine Messung von CTLA-4 auf T-Lymphozytenseite wäre hier interessant gewesen, um das korrelierende Expressionslevel zu prüfen. Würde die ko-stimulatorische Funktion überwiegen, hätte eine Herunterregulation von CD86 erwartet werden können.[63]

Die weite Streuung von LAG-3 auf ALL-Blasten wird in unseren Versuchen bestätigt. Dabei wurde keine signifikante Differenz zwischen der Expression auf Blasten gesunder und leukämischer Kinder detektiert.[36] LAG-3 gilt als häufig auf T-Zellen exprimierter Checkpoint, der auch auf aktivierten B-Zellen und DCs zu finden ist und bei der Interaktion mit MHCII bei hämatoonkologischen Erkrankungen ko-inhibitorische Funktionen erfüllen kann. Die vereinzelte Hochregulation dieses Moleküls auf einigen Tumorzellen könnte somit dafür sorgen, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen weniger gegen die malignen Blasten vorgehen.[64]

Die erwartete hohe Expression von PD-L1 auf der Oberfläche der Blasten bleibt aus. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Blasten von gesunden und leukämischen Kindern. Die leukämischen Blasten weisen auch hier eine größere Streuung auf, jedoch werden Expressionslevels von 30 % nie überschritten, während die Vordaten Expressionen bis 100 % beschreiben.[36]

Die Signifikanzen von CTLA-4 sowohl cytoplasmatisch als auch extrazellulär auf Blastenseite sollten aufgrund der fehlenden Genauigkeit des Durchflusszytometers unter dem 1 % Niveau bei extrem niedrigen Expressionswerten als nicht relevant gewertet werden. Die niedrige Expression korreliert mit der allgemeinen Auffassung, dass sich CTLA-4 vermehrt auf T-Zellseite befindet und von Blasten nicht exprimiert wird.[62]

Prognostische Erkenntnisse auf das Therapieansprechen oder das Rezidivgeschehen konnten wir anhand der Checkpointexpression auf leukämischen Blasten nicht gewinnen.

5.2.2 Cytoplasmatisches PD-L1 mit großer Streuung bei ALL Patienten

Einer der größten Unterschiede liegt in der interindividuell sehr verschiedenen Expression von cytoplasmatischem PD-L1 auf Blasten von ALL Patienten im Vergleich zu recht homogenen Expressionslevels bei Gesunden. Im Median liegt die cytoplasmatische PD-L1 Expression auf Blasten leukämischer Kinder bei 25 % mit einer Streuung auf bis zu 100 %, wohingegen PD-L1 bei Gesunden das 15 %-Level nicht überschreitet. Die cytoplasmatische Expression liegt bei beiden Kohorten über der Expression von PD-L1 der jeweiligen Kohorte auf der Zelloberfläche. In der Literatur ist für orale Tumore ebenfalls vermehrt cytoplasmatische Expression von PD-L1 im Gegensatz zur Expression auf der Zelloberfläche beschrieben.[65] Es gibt unabhängig prognostische Erkenntnisse darüber, dass eine höhere PD-L1-Expression auf Tumorzellen bei verschiedenen Tumorerkrankungen cytoplasmatisch und auf der Zelloberfläche mit einem besseren Überleben einhergeht, was die ko-inhibitorischen Funktionen nicht widerlegt, jedoch deren Konsequenz in eine andere Richtung lenkt.[66, 67] Die erhöhte PD-L1-Expression auf

Tumorzellen kann die CD4⁺/PD-1⁺ und CD8⁺/PD-1⁺ T-Zellen hochregulieren. Diese Vermehrung der Immunzellen in der Tumorumgebung ist vielfach mit einer verbesserten Prognose beschrieben. Zugleich kann ein besserer Angriffspunkt für PD-1/PD-L1 Blockaden geschaffen werden.[66, 68]

5.2.3 Regulation der Expression ko-stimulatorischer Checkpoints auf Blasten folgt keinem einheitlichen Muster

Auch die Expression ko-stimulatorischer Checkpoints wurde in den Analysen von *Feucht et al.* [36] untersucht. Durch unsere Ergebnisse können nicht alle der vorbeschriebenen Erkenntnisse reproduziert werden.

Auch hier imponieren nur wenige Unterschiede zwischen den Blasten Kranker und Gesunder. Die Streuung der Checkpointexpression ist auf leukämischen Blasten wesentlich größer. Die Expression von CD70 bestätigt den vorher entdeckten Trend für eine höhere Expression auf der Oberfläche von ALL-Blasten im Vergleich zu gesunden Blasten signifikant.[36] Während die Expression von CD70 auf Blasten Gesunder die 5 % Grenze nicht überschreitet, können die Expressionswerte auf Blasten leukämischer Kinder auf über 80 % ansteigen, was im Median einen Wert von ca. 15 % bedeutet. Der Nutzen dieser Hochregulation von CD70 kann sich in der Aktivierung des engl. Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB)-Signalweges begründen, welcher durch Interaktion von CD27 und CD70 die Proliferation und den Erhalt der Tumorzellen fördert.[69] Für die CD27 Expression ermitteln wir bei leukämischen Blasten einen Median unterhalb des Expressionsniveaus auf Blasten gesunder Kinder. ALL-Blasten haben auch bei diesem Checkpoint eine größere Streuung der Expressionshöhe.

CD70 und CD27 gehören der TNF-Rezeptorfamilie an und sind in ihrer gemeinsamen Existenz bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) auf malignen Zellen beschrieben, während zu der Expression beider Checkpoints bei B-Vorläufer ALL wenig bekannt ist.[70] Die CD70 Expression ist höher auf ALL-Blasten, während die Blasten gesunder Spender diesen Checkpoint nur sehr gering exprimieren. Die CD27-Expression ist zwar auf gesunden und leukämischen Blasten in unseren Versuchen vorhanden, jedoch nicht in der erwarteten Höhe. *Feucht et al.* beschreiben vermehrte Expression auf leukämischen Blasten, dies kann bei unseren Versuchen nicht bestätigt werden.[36] Eine Blockade der CD27/CD70-Achse mittels CD27 oder CD70 Antikörpern in ALL Patienten mit hohen Expressionswerten in vitro behindert die Proliferation der Tumorzellen, was den Nutzen dieses Signalweges für die Leukämieentwicklung unterstreicht. Bekannt ist außerdem die Korrelation zwischen einer chromosomalen Aberration und besonders hoher CD27-Expression.[70] Es ist möglich, dass die niedrige Frequenz von CD27 unserer

Patienten mit der Auswahl der Patienten und den in unseren Kohorten wenig vorhandenen chromosomalen Aberrationen zusammenhängen.

Die Expression von CD40 weist eine ähnliche Verteilung auf wie in der Literatur beschrieben. Es wird auf ALL-Blasten und gesunden Blasten ungefähr gleich stark exprimiert und zeigt auf Leukämiezellen einen etwas größeren Expressionsspielraum. CD40 auf gesunden sowie malignen Vorläufer-B-Zellen interagiert mit CD40L auf T-Helfer Zellen. Diese T-Helfer Zellen sorgen somit für eine Aktivierung der Leukämiezelle, weshalb das teilweise höhere Expressionsniveau auf ALL-Blasten der Leukämieentwicklung zugutekommen. Diese Aktivierung beinhaltet eine Proliferation und eine Hochregulation von CD70, sowie IL-3, was die Ausbreitung der Leukämie fördert. Die Leukämiezelle kann die T-Helfer Zelle anlocken, zur weiteren CD40L Präsentation anregen und somit eine positive, leukämiefördernde Immunantwort generieren.[71]

Die Expression von CD80 ist auf allen unserer untersuchten Kohorten derart gering, dass der Unterschied nur sehr vorsichtig betrachtet werden sollten.

5.2.4 Die Checkpointexpression verändert sich durch T-Zell Stimulus unabhängig vom Krankheitsverlauf

Wir konnten eine Reaktion der Blasten auf die Stimulation mit TNF- α und IFN- γ detektieren. Die Expression aller von uns untersuchten ko-inhibitorischen Checkpoints HVEM, LAG-3, CTLA-4, TIM-3 und PD-L1 steigerte sich durch die Inkubation mit TH-1-Zytokinen teilweise auf mehr als die doppelte Menge. Dies ist physiologisch durch die ko-inhibitorische Regulation der vorhandenen Immunantwort zu erklären und könnte in vivo eine überschießende Reaktion verhindern.

PD-L1 wurde zuvor als signifikant zu stimulierender Checkpoint beschrieben, was wir in unseren Versuchen nur im Trend reproduzieren können.[36] IFN- γ sorgt bei diversen Zelllinien schon bei 0,2 $\mu\text{g/ml}$ über 24-72 Stunden für eine mehr als zwanzigfache PD-L1 Erhöhung, die wir selbst mit mehr als der doppelten IFN- γ Menge nicht auslösen können.[72]

HVEM dagegen wird durch die Stimulation mehr als verdoppelt, was die physiologische Immunantwort-regulierende Wirkung des Moleküls bekräftigt. Durch die verschiedenen Liganden und dadurch resultierenden Funktionen von HVEM ist der Nutzen der Hochregulation speziell in unserem Versuch nicht vollständig geklärt, ohne dass der interagierende Ligand detektiert ist. Die ko-stimulatorischen Liganden, wie LT- α und LIGHT ähneln der TNF- α Domäne und es besteht die Möglichkeit einer HVEM-Überexpression bei TNF- α Milieu.[61]

Dass sich die Expression von CD86 hingegen durch die Stimulation mit T-Zellsignalen signifikant erniedrigt, kann aufgrund der ko-stimulatorischen Funktionsmöglichkeit bei der Interaktion mit CD28 zustande kommen, welche für den Immune-Escape vermindert werden sollte, damit das Immunsystem weniger aktiv gegen die malignen Zellen vorgehen kann. Außerdem löst CD86 physiologisch eine IFN- γ Ausschüttung aus, was eventuell eine regulatorische Feedback Funktion haben könnte und dementsprechend unsere Stimulation die Information für die Herunterregulation von CD86 vermittelt.[73] Durch die Ausschüttung von IFN- γ können T-Gedächtniszellen aktiviert werden, die dann zu einer verbesserten Immunantwort führen können.

Auf Monozyten, DCs und verschiedenen Untergruppen von T-Zellen wird die TIM-3-Expression bei Melanom-Patienten hochreguliert. Diese Reaktion ist meist in Kombination mit PD-1-Hochregulation auf T-Zellen zu beobachten und ermöglicht neue Therapie-Angriffspunkte.[74] TIM-3 auf Blastenseite wird im Laufe der Blastenentwicklung kontinuierlich hochreguliert, was mit der Expression von Tyrosinkinase-Rezeptoren (Kit) zusammenhängen kann.[75] Außerdem sorgt TIM-3 bei der Interaktion mit Galectin-9 (Gal-9) für eine Vermehrung der TH-1-Apoptose und eine geringere IFN- γ -Ausschüttung. Dies könnte die kompensatorische Hochregulation aufgrund von hohen IFN- γ -Levels erklären.[76] In unserem Fall bleibt die Untersuchung der T-Zellen auf den oben beschriebenen Stimulus ungeklärt, weil zu selten genug Zellen für einen Test der Induzierbarkeit auf T-Zellen und Blasten vorhanden waren. Laut Literatur wird TIM-3 ebenfalls als Exhaustion-Marker bei IL-2, IFN- γ und TNF- α auf T-Zellen hochreguliert.[77] Insgesamt fällt auf, dass ein Großteil der Blasten innerhalb der Stimulationszeit zugrunde geht. Dies könnte zum einen durch die Instabilität und Anfälligkeit dieses Zelltyps bei in-vitro Bedingungen kommen, oder aber durch ausgelöste Apoptose, wie teils bei Transcriptional-Growth-Factor- (TGF- β) oder Interleukin-4-(IL-4) Behandlung beschrieben ist.[71]

5.2.5 ALL Patienten zeigen im Knochenmark anteilig weniger CD8⁺ T-Zellen als gesunde Spender

Auf T-Zellseite finden wir einige Auffälligkeiten. Ob die Blasten die T-Zellen verändert haben oder ob sich aufgrund der T-Zellbesonderheiten die B-Vorläufer-Leukämie entwickelt hat, muss hypothetisch bleiben.[78]

Der Anteil CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen ist bei gesunden Kindern höher als bei ALL Patienten, wobei bei leukämischen Kindern der Anteil der CD4⁺ T-Helfer Zellen geringfügig höher ist und der Anteil der CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻ doppelt negativen T-Zellen verglichen mit den T-Zellen gesunder Kinder fast doppelt so hoch ist. Letzteres könnte daran liegen, dass die T-Zellen von ALL Patienten häufiger und schneller reproduziert

werden müssen und daher die erste Entwicklungsstufe der T-Zellen noch vermehrt im Knochenmark vorhanden ist, bevor sie im Thymus selektiert werden.[79] Der Grund für eine abweichende Verteilung von $CD3^+/CD8^+$ und $CD3^+/CD4^+$ im Vergleich zu gesunden Kindern ist bislang nicht geklärt. Eine Hypothese ist die stetige ineffektive Aktivierung der T-Zellen von Patienten im Knochenmark mit folgender Apoptose durch mangelnde Immunkompetenz.[80] Der Anteil an $CD3^+/CD4^+$ T-Zellen ist im Knochenmark von Patienten höher als in gesunden Kindern. Hier ist zu bedenken, dass B-Vorläufer ALL Patienten absolut meist weniger $CD3^+$ T-Zellen im Knochenmark besitzen als gesunde Kinder.

Bei CLL werden erhöhte $CD3^+/CD8^+$ Anteile neben verminderten $CD3^+/CD4^+$ Anteilen bei erkrankten Patienten in der Literatur beschrieben.[81] Die genauen Mechanismen des Blasteneinflusses auf die T-Zell-Entwicklung bei B-Vorläufer ALL bleiben bislang ungewiss. Der Anteil der $CD3^+/CD4^+/CD8^+$ T-Zellen ist bei allen Gruppen sehr niedrig, aber gleichermaßen anteilig ausgeprägt. In einen $CD3^+/CD4^+/CD8^+$ -Zustand kommen die T-Zellen nur für einen kurzen Moment, bevor sie sich in eine der T-Zellreihen differenzieren und CD4 oder CD8 wieder ablegen.[82] Die Rolle dieses T-Zelltypen in malignen Erkrankungen ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt Hypothesen zu Antitumorwirkung, prometastatischer Wirkung sowie starker Interleukinproduktion.[83] Diese Funktionen wurden aufgrund des sehr geringen Expressionslevels bei allen Kohorten in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

5.2.6 Die Verteilung der T-Zelltypen und deren Erschöpfungszustand variiert bei Kindern mit und ohne Vorläufer B-ALL stark

Man geht davon aus, dass alle im Knochenmark beherbergten Zellen wie Mesenchymzellen und T- Zellen durch verschiedene Interaktionen an der Entwicklung einer B-Vorläufer ALL beteiligt sind.[71]

Die unterschiedliche Verteilung der T-Zell-Phänotypen bei gesunden und leukämischen Kindern bekräftigt die Hypothese einer Interaktion zwischen T-Zellen und Blasten. Gesunde Kinder besitzen ca. 50 % naive, beziehungsweise Stem Cell-like Memory T-Zellen (Tscm/Tn). Kinder mit B-Vorläufer ALL besitzen lediglich einen Anteil von rund 10 % dieses Phänotyps. Die exakte Differenzierung ist aufgrund der von uns genutzten Marker CD62L und CD45RO nicht möglich. Tn stellt die erste Entwicklungsstufe der T-Zellen dar, während Tscm bekannt ist für eine hohe Kapazität zur Proliferation, langes Überleben sowie die Fähigkeit sich in alle T-Zell-Phänotypen zu entwickeln.[84-86] Bei T-Lymphozyten, die aus tumorbefallenen Lymphknoten stammen, wird eine Veränderung beschrieben, die mit einer

deutlichen Vermehrung des Tscm-Anteils und einer Vermehrung der Central-Memory T-Zellen (Tcm) einhergeht im Vergleich zu nicht befallenen Lymphknoten.[84] Diese tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) können Exhaustion-Marker exprimieren und sind dann funktionell weniger relevant.[87] Aufgrund der Nähe zu den leukämischen Blasten im Knochenmark, könnten die T-Zellen des Knochenmarks in unserem Fall funktionell die Rolle der TILs annehmen. Auch der Anteil der Tcm im Knochenmark ist bei Kindern mit einer B-Vorläufer ALL mit unter 4 % kleiner als der Anteil von 20 % bei gesunden Kindern. Dies könnte ein Hinweis auf eine verminderte T-Zellfunktion schon vor dem Auftreten der Leukämie sein. Bei chronischen Infektionen mit HIV findet sich ebenfalls eine Verminderung der CD4⁺ Tscm. Dies führt zu einer verminderten Immunantwort und einem Progress der chronischen Erkrankung.[85]

Der Anteil der T-Effector-Memory Zellen (Tem) zeigt in unserem Fall keine Unterschiede zwischen leukämischen und gesunden Kindern. Allerdings findet sich ein großer Unterschied bezüglich des Anteils von Effector T-Zellen (Teff). Diese machen im Knochenmark gesunder Kinder nur einen Anteil von unter 15 % aus, während bei erkrankten Kindern bis zu 65 % Teff zu finden sind. Man kann sagen, dass die B-Vorläufer ALL die T-Zellen des Knochenmarks in einen weiter differenzierten Zustand versetzt. Diese T-Zellpopulation entwickelt sich nach dem Antigenkontakt, welcher durch die Tumorzellen schon geschehen ist. Das Verhältnis zwischen immunsuppressiven, regulatorischen T-Zellen (T-Reg) und Teff scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit des Immunsystems zu haben gegen den Tumor vorzugehen.[88] T-Regs beispielsweise unterdrücken die Wirkung der Teff und ermöglichen so ein Umfeld, welches das Tumorwachstum trotz Teff begünstigt. Eine niedrige T-Reg:Teff Ratio spricht in einigen Tumorarten für einen besseren Verlauf.[88] In unserem Fall können wir die T-Reg-Menge nicht bestimmen, der hohe Anteil Teff jedoch lässt entweder auf die Inhibition der Funktion oder eine Ineffizienz der Teff bei B-Vorläufer ALL schließen.

Bei insgesamt anteilig mehr T-Zellen im Knochenmark gesunder Kinder, verändert sich das Verhältnis der Phänotypen mit einer B-Vorläufer ALL am auffälligsten von einem sehr hohen Anteil Tscm/Tn bei gesunden Kindern, zu einem sehr großen Anteil Teff im leukämischen Knochenmark. Diese Erkenntnis deckt sich mit einem Teil der in der Literatur beschriebenen Verteilung der Phänotypen bei verschiedenen Tumorerkrankungen.[89, 90] Außerdem ist bereits beschrieben, dass sich binnen 1-2 Wochen die Tn bei anhaltendem Antigenkontakt in Teff differenzieren und sich daher die Verteilung ändert. Diese Veränderung ist sowohl bei Impfungen als auch bei Infektionen zu beobachten und damit auch bei fortbestehendem Antigenkontakt durch einen Tumor nachvollziehbar.[91]

Exhaustion-Marker sind in verschiedenen onkologischen Erkrankungen schon beschrieben und detailliert untersucht worden. Tumorabhängig gibt es unterschiedliche Vordaten

bezüglich der Entwicklung von Exhaustion-Markern. Bei akuter myeloischer Leukämie soll es keine Korrelation zwischen dem Krankheitsverlauf und der Erschöpfung von T-Zellen geben. Dementsprechend reduziert sich auch der Nutzen einer Checkpoint-Inhibitor Therapie.[90] Bei Gliomen wiederum wird ein Effekt der T-Zell Erschöpfung auf den Verlauf einer Erkrankung beschrieben.[92] Aufgrund der geringen Vordaten bezüglich der Rolle von Exhaustion-Markern bei pädiatrischer B-Vorläufer ALL, ist die Betrachtung der Exhaustion-Marker von großer und innovativer Bedeutung.

Man geht bei den meisten tumorösen Erkrankungen davon aus, dass aufgrund der Anwesenheit von Tumorzellen die Expression von Exhaustion-Markern sowohl auf CD3⁺/CD4⁺, als auch auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen hochreguliert wird.[36, 93, 94] Dies bestätigt sich in unseren Analysen im Vergleich zu den T-Zellen Gesunder nur teilweise. Auch die Differenzierung nach CD4 und CD8 macht kaum einen Unterschied. Die TIM-3⁺/2B4⁺ doppelt positiven und die dreifach positiven T-Zellen sind im leukämischen Knochenmark insgesamt kaum vorhanden, während alle anderen Kombinationen in unterschiedlichem Ausmaß in allen Untergruppen existieren.

In der T-Zellentwicklung bis zur Stufe der Tcm sind die meisten der drei getesteten Exhaustion-Marker in nahezu allen Kombinationen zumindest im Trend mehr auf den T-Zellen leukämischer Kinder als auf T-Zellen gesunder Kinder zu finden. Bei den Tscm/Tn besitzen die gesunden Kinder einen wesentlich höheren Anteil von T-Zellen ohne jeden Exhaustion-Marker. Außerdem ist neben einem Trend für die Erhöhung aller Kombinationen der Anteil von T-Zellen mit höherem 2B4-Expressionslevel und der Anteil der PD-1⁺/2B4⁺ doppelt positiven T-Zellen höher im Knochenmark von B-Vorläufer ALL Patienten. Dies spricht für einen intensiveren Erschöpfungszustand mit geringerer Proliferationsfähigkeit und Effektivität in einer der ersten Entwicklungsstufen beim Auftreten einer B-Vorläufer ALL. Der Trend setzt sich auch in der nächsten Stufe, den Tcm, durch, jedoch mit geringerer Deutlichkeit. In der Literatur beschrieben ist die verminderte T-Zellantwort durch Expression von Exhaustion-Markern bei malignen Erkrankungen.[93] In Hinblick auf Tumor Escape Mechanismen, würden wir vermehrt PD-1 auf T-Zellen leukämischer Kinder erwarten. Unsere konträren Erkenntnisse auf Tcm bleiben daher ungeklärt und bedürfen weiterer funktioneller Tests.

Im weiteren Verlauf der Differenzierung finden sich veränderte Erschöpfungszustände je nach Phänotyp.[95] In unseren Analysen lassen sich kaum Regelmäßigkeiten bezüglich der Exhaustion-Marker-Expression im Verlauf der Differenzierung der T-Zellen finden. Leukämische T-Zellen und T-Zellen gesunder Kinder im Knochenmark zeigen in allen Subtypen variable Expression der meisten Exhaustion-Marker. Dies widerspricht in unserem Fall der Theorie, dass der Antigenkontakt durch maligne Erkrankungen die

Expression von Exhaustion-Markern fördert und damit weiter differenzierte T-Zell-Subtypen leukämischer Kinder eine vermehrte Expression aufweisen.[36]

Eine Erklärung für teilweise wenig weiter differenzierte T-Zellen mit einer Vielzahl an Exhaustion-Markern könnte die Apoptose sein.[96] *Chiu et. al.* berichten von einer erhöhten Apoptoserate von CD3⁺/PD-1⁺ T-Zellen bei Adenokarzinomen des Magens. Sollten Tem aus unseren Analysen mit hohen Levels an PD-1 und 2B4 einer erhöhten Apoptoserate nachgehen, wäre dies eine Erklärung für weniger Teff mit eben diesen Exhaustion-Markern. Weitere funktionelle Tests müssen diese Hypothese prüfen.

Die Kombinationen mit TIM-3-Expression bleiben tendenziell vermehrt in B-Vorläufer ALL Patienten ausgebildet. Vor allem die TIM-3 einfach positiven T-Zellen sind wesentlich häufiger im Knochenmark von B-Vorläufer ALL Patienten zu finden.

Bei der Betrachtung der Teff fällt auf, dass hier die Unterschiede bezüglich der Exhaustion-Marker-Expression am auffälligsten ausgeprägt sind. Es imponiert wieder der größere Anteil Teff ohne Exhaustion-Marker-Expression im Knochenmark von B-Vorläufer ALL Patienten verglichen mit dem Knochenmark gesunder Kinder. Dies könnte auf einen hohen Teff-Umsatz durch Apoptose erschöpfter T-Zellen bei B-Vorläufer ALL zurückzuführen sein, wie es bei chronischen Entzündungen in der Literatur beschrieben wird.[97] Zudem ist entgegen der Erwartung ein größerer Anteil 2B4⁺ und PD-1⁺/2B4⁺ T Zellen im Knochenmark gesunder Kinder zu detektieren, während bei leukämischen Kindern dieser T-Zell-Subtyp kaum ausgeprägt ist. Nur die TIM-3⁺ T-Zellen verhalten sich erwartungsgemäß innerhalb dieses Phänotyps. Sie repräsentieren in leukämischen Kindern einen größeren Anteil als bei gesunden Kindern. Aufgrund der verschiedenen Funktionen der Exhaustion-Marker TIM-3 und PD-1, wie Aktivierung anderer T-Zellen oder Reduktion der Effektivität von T-Zellen, lässt sich die primäre Funktion in der B-Vorläufer ALL bislang nicht ausreichend erklären.[98]

Es ist beschrieben, dass erschöpfte T-Zellen durch kontinuierlichen Antigenkontakt häufig progredient ihre Funktionen verlieren.[93] In unseren Analysen zeigt sich jedoch keine Persistenz der Exhaustion-Marker über die Differenzierungsstufen der verschiedenen T-Zell-Subtypen hinweg, sodass jeder T-Zell-Phänotyp individuell betrachtet werden sollte. Insgesamt macht die Unterteilung von CD3⁺ und CD3⁺/CD4⁺ oder CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen für die Expression der Exhaustion-Marker keine Unterschiede. Eine Ausnahme ist der Subtyp der Tem Zellen. Auch das deckt sich nur teilweise mit bisher bekannten Erkenntnissen aus der Literatur. Zwar sind die Tem als die T-Zellen beschrieben, die die meisten Exhaustion-Marker exprimieren, jedoch sind insgesamt häufiger Unterschiede in der CD3⁺/CD8⁺ Zelllinie beschrieben, welche mit der Erschöpfung und der vermehrten Expression ko-inhibitorischer Marker einhergehen und in Dysfunktion, wie verminderter Zytokinproduktion, Hypoproliferation und letztlich Apoptose enden.[90, 99]

Bei CD3⁺/CD4⁺ Tem ist die Expression von PD-1 bei gesunden Kindern im Median fast doppelt so deutlich wie in erkrankten Kindern. Sowohl bei chronischen Entzündungen, als auch bei malignen Erkrankungen weisen die T-Zellen normalerweise vermehrt PD-1-Expression auf.[99, 100] *Riches et al.* berichten bei Tem in chronisch lymphatischer Leukämie sogar von der höchsten PD-1 Expression verglichen mit anderen T-Zell-Subtypen, die durch die ko-inhibitorische Wirkung die Tumorausbreitung begünstigen. Die Expression von Exhaustion-Markern auf beispielsweise CD3⁺/CD8⁺ wird in diesem Fall als „Pseudeoerschöpfung“ angesehen. Die T-Zellen verlieren nur einen Teil ihrer Wirkung, da die zytotoxischen T-Zellen noch TNF- α , IFN- γ und IL-2 ausschütten. Ein solcher Zustand wäre hier auch hier vorstellbar.[99]

Neben den Berichten über Veränderung der Exhaustion-Marker auf T-Zellen bei malignen Erkrankungen gibt es auch vereinzelt Analysen, die keine Veränderung feststellen. *Schnorfeil et al.* untersuchen beispielsweise die T-Zellen von Erwachsenen mit akuter myeloischer Leukämie (AML).[90] Bei dieser Leukämieform entwickeln sich die Unterschiede auf T-Zellen erst im Verlauf der Erkrankung. Zu Beginn gibt es keinen Unterschied zwischen der Expressionshöhe von PD-1, TIM-3 und 2B4 von gesunden zu kranken Menschen im Gegensatz zu dem Vergleich mit einer chronischen Erkrankung wie Human Immunodeficiency Virus (HIV). Erst Patienten mit einem Rezidiv nach Stammzelltransplantation haben in dieser Studie eine ansteigende PD-1-Expression.[90]

5.2.7 Hohe TIM-3-Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark bei Erstdiagnose erhöhen das Rezidivrisiko

Die Analyse von 100 Patientenproben hat gezeigt, dass pädiatrische B-Vorläufer ALL Patienten mit hoch TIM-3⁺ (>14 %) CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark ein um den Faktor 7,2 erhöhtes Rezidivrisiko besitzen. Auch TIM-3⁺/PD-1⁺ doppelt positive Knochenmark T-Zellen von >8 % auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen gehen mit einer signifikant höheren Rezidivwahrscheinlichkeit einher. Es ist bekannt, dass hohe TIM-3-Levels mit einem gesteigerten Potenzial zum Metastasieren in zervikalen Tumoren korrelieren, hohes PD-1-Niveau bei TIM-3⁺ T-Zellen bei akuter myeloischer Leukämie (AML) mit einem erhöhten Risiko für Rezidive einhergehen und 2B4 die schnellere Entwicklung von Leukämien unterstützt.[101-103] Somit ist auch bei pädiatrischer B-Vorläufer ALL eine prognostische Relevanz von TIM-3 denkbar und bisher nicht systematisch untersucht.

Sowohl bei den CD3⁺ T-Zellen insgesamt, als auch bei den CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen ließen sich deutliche Unterschiede feststellen. CD3⁺/CD4⁺ Teff weisen bei Erstdiagnose in der Rezidivkohorte einen signifikant höheren Anteil TIM-3⁺ T-Zellen auf, als bei Kindern, die im Verlauf kein Rezidiv entwickeln. Diese Erkenntnisse lassen sich in der Literatur

untermauern. TIM-3 sorgt vielfach für Immuntoleranz der T-Zellen in Autoimmunerkrankungen und könnte hier als TILs die Toleranz gegenüber den leukämischen Blasten im Knochenmark begünstigen. [104-106] Vordaten ergeben in malignen Erkrankungen, wie dem malignen Melanom und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) bekannte TIM-3-abhängige Dysfunktionen und Erschöpfungszustände der T-Zellen, welche bei der B-Vorläufer ALL den Zustand der T-Zellen im Knochenmark widerspiegeln könnten. [74, 91, 92, 107]

TIM-3 interagiert mit Galectin-9, Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1), Phosphatidylserine (PtdSer) und High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) (siehe Tabelle 4). Die Bindung an diese Liganden führt unter anderem zum Untergang einer bestimmten Gruppe von TH-1, einer geringeren Produktion von IFN- γ und einer Verminderung der immunogenen Signale untergegangener Tumorzellen. Somit kann TIM-3-Expression auf T-Zellen das Tumorwachstum erleichtern.[108-110] Die hier vorgestellten Versuche liefern Hinweise auf eine mögliche Interaktion der leukämischen Blasten mit der T-Zelle über TIM-3. Den detaillierten funktionellen Zusammenhang werden weitere Analysen in vitro und in vivo beleuchten müssen.

Die Expression von PD-1 alleine auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen zeigt keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf das Rezidivgeschehen. Erst vermehrte Expression der Kombination von TIM-3⁺/PD-1⁺ auf T-Zellen im leukämischen Knochenmark zeigt erneut eine gesteigerte Rezidiventwicklung. *Fourcade et. al.* berichten ebenfalls von verstärkter Dysfunktion mit verringerter Zytokinfreisetzung bei Doppelsexpression auf CD8⁺ T-Zellen bei NSCLC im Gegensatz zu PD-1⁺ T-Zellen.[74] Eine Blockade beider Moleküle wird als effektivere Kontrolle des Tumorwachstums angesehen.[74]

Die Expression von Checkpointmolekülen auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen zeigt in unseren Versuchen keine signifikanten Erkenntnisse in Hinblick auf die Prognose für die Entstehung eines Rezidives.

Möchte man Kinder mit einer B-Vorläufer ALL und Rezidiv aufgrund der allgemein schlechteren Prognose früh detektieren, so liefert das TIM-3-Level auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen einen sinnvollen Frühmarker. Da das Hauptproblem der pädiatrischen B-Vorläufer ALL derzeit noch in den Therapieoptionen für Kinder mit Rezidiv liegt, kann dies einen entscheidenden Fortschritt bedeuten, weil man die Möglichkeit hätte noch vor der Entwicklung eines Rezidives die Therapie zu modulieren. Gelingt es, diese Ergebnisse mit prospektiven Tests zu untermauern, könnte TIM-3 als erster immunologischer, prognostischer Marker der B-Vorläufer ALL gewertet werden. Die Therapie der B-Vorläufer ALL könnte durch Angriff der TIM-3-Achse neue Immuntherapien gewinnen.

5.3 Ausblick und mögliche Konsequenzen

Zusammenfassend konnten wir in der systematischen Analyse einer großen Patientenkohorte mit bekanntem klinischen Outcome zeigen, dass sich die T-Zellen im Knochenmark von B-Vorläufer ALL-Patienten signifikant von denen gesunder Spender unterscheiden. Eine erhöhte Expression des Exhaustion-Markers TIM-3 auf CD4⁺ T-Zellen geht hierbei mit einem 7,2-fach erhöhten Rezidivrisiko einher. Außerdem korreliert eine Vielzahl von Auffälligkeiten mit der TIM-3-Expression, weshalb der Nutzen einer TIM-3-Blockade bei B-Vorläufer ALL in Betracht gezogen werden könnte.

Bestätigen sich die Veränderungen der T-Zellen auch in weiteren Analysen, die nun prospektiv stattfinden, ergeben sich durch die Betrachtung der Exhaustion-Marker TIM-3, 2B4 und PD-1 neue Möglichkeiten, den Verlauf einer Prä-B-ALL oder cALL schon zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einzuschätzen. Prognostisch hätte dies den Nutzen, dass Kinder mit einem niedrigen TIM-3-Level auf T-Zellen bei Erstdiagnose mit einer größeren Wahrscheinlichkeit kein Rezidiv erleiden werden. Außerdem könnte man daraus schließen, dass Kinder mit zu Beginn hohen TIM-3-Levels in engeren Intervallen kontrolliert werden, um ein Rezidiv noch früher detektieren und behandeln zu können. Bislang sind keine immunologischen Marker bekannt, die prognostische Vorteile in der B-Vorläufer ALL bieten, weshalb unsere Ergebnisse Fortschritte bedeuten könnten.

Auf Blastenseite könnte die Bedeutung der großen Streuung von cytoplasmatischem PD-L1 näher untersucht werden. Funktionelle Tests können die Bedeutung dieses Markers auf den Verlauf einer B-Vorläufer ALL näher untersuchen und dessen Nutzen für die Entstehung dieser Erkrankung erklären.

Alle unsere Ergebnisse müssen prospektiv weiter auf ihre prognostische und therapeutische Relevanz geprüft werden, jedoch haben die neuen Erkenntnisse das Potenzial für eine weitere Verbesserung des Überlebens von B-Vorläufer ALL Patienten mit ursprünglich schlechter Prognose. Wir erhoffen uns durch das Darlegen der ersten systematischen Checkpointübersicht an einer großen Kohorte von pädiatrischen B-Vorläufer ALL Patienten einen Grundstein für die zukünftige Anwendung von Immuntherapie und Checkpointinhibitoren in diesem Krankheitsgebiet legen zu können, während diese Therapieoptionen in anderen onkologischen Bereichen schon teilweise etabliert sind.

6 Zusammenfassung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung in der Pädiatrie. Bisherige Therapien erzielen in den meisten Fällen kurative Ergebnisse, welche sich deutlich bei Rezidiventwicklung und fehlendem Therapieansprechen verschlechtern. Da die ALL als eine niedrig immunogene Erkrankung gilt, sollen Expressionsmuster von sogenannten Checkpointmolekülen auf leukämischen Blasten und T-Zellen im Knochenmark detektiert werden und zu neuen Erkenntnissen für Prognose und Therapie führen.

Im Rahmen dieses Projektes wurden 100 Knochenmarkproben von pädiatrischen ALL Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mittels Durchflusszytometrie untersucht. In verschiedenen Kohorten, die durch den bekannten Krankheitsverlauf der Patienten und 13 Proben gesunder Spender zustande kamen, wurde die Induzierbarkeit der Checkpoints durch TH1-Stimulus geprüft sowie die variierenden Expressionsmuster verglichen. Im Vergleich zu gesunden Spendern exprimieren leukämische Blasten vermehrt CD70, CD86 und cyPD-L1, wobei letzteres in dieser Kohorte eine enorme Streuung der Expressionshöhe von bis zu 100 % aufweist. CD27 und HVEM hingegen ist auf leukämischen Blasten weniger exprimiert. Während HVEM auf diesen Blasten durch TH1-Stimulus vermehrt exprimiert wird, wird CD86 herunterreguliert. CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark von B-Vorläufer ALL Patienten sind reduziert. Außerdem ergibt sich im Vergleich zu Proben gesunder Spender für CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺ und CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen bei Erstdiagnose einer B-Vorläufer ALL eine Umverteilung der T-Zellphänotypen zugunsten der Teff, bei abnehmendem Anteil Tscm/n und Tcm. Für die Prognostik bezüglich Rezidiventwicklung ist bedeutsam, dass Patienten mit >14 % TIM-3⁺ CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark ein 7,2-fach höheres Risiko für die Entwicklung eines Rezidives haben. Gleiche Tendenz gilt für eine TIM-3⁺/PD-1⁺-Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen von >8 %, nicht jedoch für PD-1⁺ T-Zellen und CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen.

Funktionelle Experimente müssen den Mechanismus der TIM-3-Überexpression und der T-Zell-Erschöpfung weiter untersuchen. Prospektive Studien sind erforderlich, um den prognostischen Wert zu bestätigen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Relevanz von Knochenmark T-Zellen kann in Zukunft Optionen der Immuntherapie der ALL eröffnen.

7 Literaturverzeichnis

1. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
2. Swerdlow SH, C.E., Harris NL, et al, *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon 2008.
3. Hunger, S.P., et al., *Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group*. J Clin Oncol, 2012. **30**(14): p. 1663-9.
4. Kinderkrebsinfo, D., *ALL in Remission*. 2017.
5. Locatelli, F., F. Moretta, and S. Rutella, *Management of relapsed acute lymphoblastic leukemia in childhood with conventional and innovative approaches*. Curr Opin Oncol, 2013. **25**(6): p. 707-15.
6. Whittington, M.D., et al., *Long-term Survival and Value of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Pediatric Patients With Relapsed or Refractory Leukemia*. JAMA Pediatr, 2018.
7. Clarke, R.T., et al., *Clinical presentation of childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis*. Arch Dis Child, 2016. **101**(10): p. 894-901.
8. Schaefer HE, R.U., Herbst EW, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 2001:544-52. 2001: Thieme.
9. Ward, E., et al., *Childhood and adolescent cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(2): p. 83-103.
10. Corrigan, J.J., S.A. Feig, and P. American Academy of, *Guidelines for pediatric cancer centers*. Pediatrics, 2004. **113**(6): p. 1833-5.
11. Szarzynska-Zawadzka, B., et al., *Cost-effective screening of DNMT3A coding sequence identifies somatic mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Eur J Haematol, 2017.
12. Beldjord, K., et al., *Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2014. **123**(24): p. 3739-49.
13. Pui, C.H., et al., *Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 1998. **16**(12): p. 3768-73.
14. Qin, X., M.Y. Zhang, and W.J. Liu, *Application of minimal residual disease monitoring in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018. **22**(20): p. 6885-6895.
15. Lustosa de Sousa, D.W., et al., *Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival*. Rev Bras Hematol Hemoter, 2015. **37**(4): p. 223-9.
16. Borowitz, M.J., et al., *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5477-85.
17. Nachman, J.B., et al., *Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1112-5.
18. Mullighan, C.G., et al., *BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 110-4.
19. Nguyen, K., et al., *Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study*. Leukemia, 2008. **22**(12): p. 2142-50.
20. Baxby, D., *Edward Jenner's Inquiry; a bicentenary analysis*. Vaccine, 1999. **17**(4): p. 301-7.
21. Levine, D.B., *The Hospital for the Ruptured and Crippled: William Bradley Coley, third Surgeon-in-Chief 1925-1933*. HSS J, 2008. **4**(1): p. 1-9.
22. Strebhardt, K. and A. Ullrich, *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(6): p. 473-80.
23. Morales, A.E., D; Bruce,W, *Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors*. Journal of Urology, 1976.
24. Bergman, P.J., *Cancer immunotherapy*. Top Companion Anim Med, 2009. **24**(3): p. 130-6.
25. Agresta, L., K.H.N. Hoebe, and E.M. Janssen, *The Emerging Role of CD244 Signaling in Immune Cells of the Tumor Microenvironment*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2809.
26. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.

27. Vinay, D.S., et al., *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies*. Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S185-S198.
28. Wedekind, M.F., et al., *Pediatric Cancer Immunotherapy: Opportunities and Challenges*. Paediatr Drugs, 2018. **20**(5): p. 395-408.
29. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer*. Nature, 2013. **500**(7463): p. 415-21.
30. Maeurer, M.J., et al., *Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen*. J Clin Invest, 1996. **98**(7): p. 1633-41.
31. Hicklin, D.J., F.M. Marincola, and S. Ferrone, *HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story*. Mol Med Today, 1999. **5**(4): p. 178-86.
32. Jacobs, J.F., et al., *Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy?* Lancet Oncol, 2012. **13**(1): p. e32-42.
33. Zou, W., *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 295-307.
34. Sideras, K., et al., *Tumor cell expression of immune inhibitory molecules and tumor-infiltrating lymphocyte count predict cancer-specific survival in pancreatic and ampullary cancer*. Int J Cancer, 2017. **141**(3): p. 572-582.
35. Sharma, P. and J.P. Allison, *Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential*. Cell, 2015. **161**(2): p. 205-14.
36. Feucht, J., et al., *T-cell responses against CD19+ pediatric acute lymphoblastic leukemia mediated by bispecific T-cell engager (BiTE) are regulated contrarily by PD-L1 and CD80/CD86 on leukemic blasts*. Oncotarget, 2016. **7**(47): p. 76902-76919.
37. Catakovic, K., et al., *T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy*. Cell Commun Signal, 2017. **15**(1): p. 1.
38. Grupp, S.A., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2013. **368**(16): p. 1509-1518.
39. Mack, M., G. Riethmuller, and P. Kufer, *A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 7021-5.
40. Hoffman, L.M. and L. Gore, *Blinatumomab, a Bi-Specific Anti-CD19/CD3 BiTE((R)) Antibody for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: Perspectives and Current Pediatric Applications*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 63.
41. Brandl, C., et al., *The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(10): p. 1551-63.
42. von Stackelberg, A., et al., *Phase I/Phase II Study of Blinatumomab in Pediatric Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia*. J Clin Oncol, 2016. **34**(36): p. 4381-4389.
43. Schlegel, P., et al., *Pediatric posttransplant relapsed/refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia shows durable remission by therapy with the T-cell engaging bispecific antibody blinatumomab*. Haematologica, 2014. **99**(7): p. 1212-9.
44. Brunet, J.F., et al., *A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4*. Nature, 1987. **328**(6127): p. 267-70.
45. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(2): p. 207-12.
46. Romani, M., et al., *Immune Checkpoints and Innovative Therapies in Glioblastoma*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 464.
47. Ness, N., et al., *The prognostic role of immune checkpoint markers programmed cell death protein 1 (PD-1) and programmed death ligand 1 (PD-L1) in a large, multicenter prostate cancer cohort*. Oncotarget, 2017. **8**(16): p. 26789-26801.
48. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(1): p. 23-34.
49. Boekstegers, A.M., et al., *MRD response in a refractory paediatric T-ALL patient through anti-programmed cell death 1 (PD-1) Ab treatment associated with induction of fatal GvHD*. Bone Marrow Transplant, 2017. **52**(8): p. 1221-1224.
50. Singh, A.K., et al., *Fatal GvHD induced by PD-1 inhibitor pembrolizumab in a patient with Hodgkin's lymphoma*. Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(9): p. 1268-70.
51. Dyck, L. and K.H.G. Mills, *Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases*. Eur J Immunol, 2017. **47**(5): p. 765-779.

52. Ahmad, F., et al., *Negative Checkpoint Regulatory Molecule 2B4 (CD244) Upregulation Is Associated with Invariant Natural Killer T Cell Alterations and Human Immunodeficiency Virus Disease Progression*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 338.
53. Anderson, A.C., N. Joller, and V.K. Kuchroo, *Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 989-1004.
54. Allahmoradi, E., et al., *CD4+ T Cells are Exhausted and Show Functional Defects in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Iran J Immunol, 2017. **14**(4): p. 257-269.
55. Ye, B., et al., *T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1694.
56. McKinney, E.F. and K.G. Smith, *T cell exhaustion and immune-mediated disease-the potential for therapeutic exhaustion*. Curr Opin Immunol, 2016. **43**: p. 74-80.
57. Das, M., C. Zhu, and V.K. Kuchroo, *Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity*. Immunol Rev, 2017. **276**(1): p. 97-111.
58. Majzner, R.G., et al., *Assessment of programmed death-ligand 1 expression and tumor-associated immune cells in pediatric cancer tissues*. Cancer, 2017. **123**(19): p. 3807-3815.
59. Bashey, A., et al., *CTLA4 blockade with ipilimumab to treat relapse of malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1581-8.
60. Lan, X., et al., *Increased BTLA and HVEM in gastric cancer are associated with progression and poor prognosis*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 919-926.
61. Steinberg, M.W., T.C. Cheung, and C.F. Ware, *The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation*. Immunol Rev, 2011. **244**(1): p. 169-87.
62. Knaus, H.A., et al., *Immunomodulatory Drugs: Immune Checkpoint Agents in Acute Leukemia*. Curr Drug Targets, 2017. **18**(3): p. 315-331.
63. Norde, W.J., et al., *Coinhibitory molecules in hematologic malignancies: targets for therapeutic intervention*. Blood, 2012. **120**(4): p. 728-36.
64. Ok, C.Y. and K.H. Young, *Checkpoint inhibitors in hematological malignancies*. J Hematol Oncol, 2017. **10**(1): p. 103.
65. Oliveira-Costa, J.P., et al., *Gene expression patterns through oral squamous cell carcinoma development: PD-L1 expression in primary tumor and circulating tumor cells*. Oncotarget, 2015. **6**(25): p. 20902-20.
66. Wu, Y., et al., *PD-1 and PD-L1 co-expression predicts favorable prognosis in gastric cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(38): p. 64066-64082.
67. Velcheti, V., et al., *Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer*. Lab Invest, 2014. **94**(1): p. 107-16.
68. Yang, C.Y., et al., *Programmed cell death-ligand 1 expression is associated with a favourable immune microenvironment and better overall survival in stage I pulmonary squamous cell carcinoma*. Eur J Cancer, 2016. **57**: p. 91-103.
69. Silence, K., et al., *ARGX-110, a highly potent antibody targeting CD70, eliminates tumors via both enhanced ADCC and immune checkpoint blockade*. MAbs, 2014. **6**(2): p. 523-32.
70. Nilsson, A., et al., *Expression of CD27-CD70 on early B cell progenitors in the bone marrow: implication for diagnosis and therapy of childhood ALL*. Exp Hematol, 2005. **33**(12): p. 1500-7.
71. Burgler, S. and D. Nadal, *Pediatric precursor B acute lymphoblastic leukemia: are T helper cells the missing link in the infectious etiology theory?* Mol Cell Pediatr, 2017. **4**(1): p. 6.
72. Brin, E., et al., *PEGylated arginine deiminase can modulate tumor immune microenvironment by affecting immune checkpoint expression, decreasing regulatory T cell accumulation and inducing tumor T cell infiltration*. Oncotarget, 2017. **8**(35): p. 58948-58963.
73. Jeannin, P., et al., *Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes*. Immunity, 2000. **13**(3): p. 303-12.
74. Fourcade, J., et al., *Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients*. J Exp Med, 2010. **207**(10): p. 2175-86.
75. Goncalves Silva, I., et al., *Differential expression and biochemical activity of the immune receptor Tim-3 in healthy and malignant human myeloid cells*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 33823-33.
76. Tao, J.L., et al., *Elevated TIM3+ hematopoietic stem cells in untreated myelodysplastic syndrome displayed aberrant differentiation, overproliferation and decreased apoptosis*. Leuk Res, 2014. **38**(6): p. 714-21.

77. Ozkazanc, D., et al., *Functional exhaustion of CD4+ T cells induced by co-stimulatory signals from myeloid leukaemia cells*. Immunology, 2016. **149**(4): p. 460-471.
78. Siska, P.J., et al., *Suppression of Glut1 and Glucose Metabolism by Decreased Akt/mTORC1 Signaling Drives T Cell Impairment in B Cell Leukemia*. J Immunol, 2016. **197**(6): p. 2532-40.
79. Xu, H., et al., *Efflux Transporters Regulate Arsenite-Induced Genotoxicity in Double Negative and Double Positive T Cells*. Toxicol Sci, 2017. **158**(1): p. 127-139.
80. Yotnda, P., et al., *Analysis of T-cell defects in the specific immune response against acute lymphoblastic leukemia cells*. Exp Hematol, 1999. **27**(9): p. 1375-83.
81. Nunes, C., et al., *Expansion of a CD8(+)PD-1(+) replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(3): p. 678-87.
82. Michelina Nascimbeni¹, E.-C.S., Luis Chiriboga², David E. Kleiner³, Barbara Rehmann¹, *Peripheral CD4/CD8 Double-Positive T cells are Differentiated Effector Memory Cells With Antiviral Functions*. Blood, 2004.
83. Overgaard, N.H., et al., *CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage?* J Leukoc Biol, 2015. **97**(1): p. 31-8.
84. Vahidi, Y., et al., *Memory CD4+ T cell subsets in tumor draining lymph nodes of breast cancer patients: A focus on T stem cell memory cells*. Cell Oncol (Dordr), 2017.
85. Lu, X., et al., *CD4+ T Memory Stem Cells Correlate with Disease Progression in Chronically HIV-1-Infected Patients*. Viral Immunol, 2017.
86. Gattinoni, L., et al., *T memory stem cells in health and disease*. Nat Med, 2017. **23**(1): p. 18-27.
87. Canale, F.P., et al., *CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8(+) T Cells-Response*. Cancer Res, 2018. **78**(17): p. 5175.
88. Roychoudhuri, R., R.L. Eil, and N.P. Restifo, *The interplay of effector and regulatory T cells in cancer*. Curr Opin Immunol, 2015. **33**: p. 101-11.
89. Peguillet, I., et al., *High numbers of differentiated effector CD4 T cells are found in patients with cancer and correlate with clinical response after neoadjuvant therapy of breast cancer*. Cancer Res, 2014. **74**(8): p. 2204-16.
90. Schnorfeil, F.M., et al., *T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment*. J Hematol Oncol, 2015. **8**: p. 93.
91. Wherry, E.J. and M. Kurachi, *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(8): p. 486-99.
92. Li, G., et al., *Molecular and clinical characterization of TIM-3 in glioma through 1,024 samples*. Oncoimmunology, 2017. **6**(8): p. e1328339.
93. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 227-42.
94. Nirschl, C.J. and C.G. Drake, *Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(18): p. 4917-24.
95. Baitsch, L., et al., *Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30852.
96. Chiu, Y.M., et al., *PD-1 and PD-L1 Up-regulation Promotes T-cell Apoptosis in Gastric Adenocarcinoma*. Anticancer Res, 2018. **38**(4): p. 2069-2078.
97. Saeidi, A., et al., *T-Cell Exhaustion in Chronic Infections: Reversing the State of Exhaustion and Reinvigorating Optimal Protective Immune Responses*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2569.
98. Dai, S., et al., *The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases*. Cell Immunol, 2014. **290**(1): p. 72-9.
99. Riches, J.C., et al., *T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production*. Blood, 2013. **121**(9): p. 1612-21.
100. Queudeville, M., R. Handgretinger, and M. Ebinger, *Immunotargeting relapsed or refractory precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia - role of blinatumomab*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 3567-3578.
101. Cao, Y., et al., *Correction: Tim-3 Expression in Cervical Cancer Promotes Tumor Metastasis*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0152830.
102. Kong, Y., et al., *PD-1(hi)TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation*. Blood Cancer J, 2015. **5**: p. e330.

103. Zhang, F., et al., *CD244 maintains the proliferation ability of leukemia initiating cells through SHP-2/p27kip1 signaling*. Haematologica, 2017. **102**(4): p. 707-718.
104. Zhou, E., et al., *Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis of patients with colon cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(7): p. 8018-27.
105. Monney, L., et al., *Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 536-41.
106. Sabatos, C.A., et al., *Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance*. Nat Immunol, 2003. **4**(11): p. 1102-10.
107. Gao, X., et al., *TIM-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30676.
108. Geng, H., et al., *Soluble form of T cell Ig mucin 3 is an inhibitory molecule in T cell-mediated immune response*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1411-20.
109. Zhu, C., et al., *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1245-52.
110. Chiba, S., et al., *Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1*. Nat Immunol, 2012. **13**(9): p. 832-42.

8 Anhang

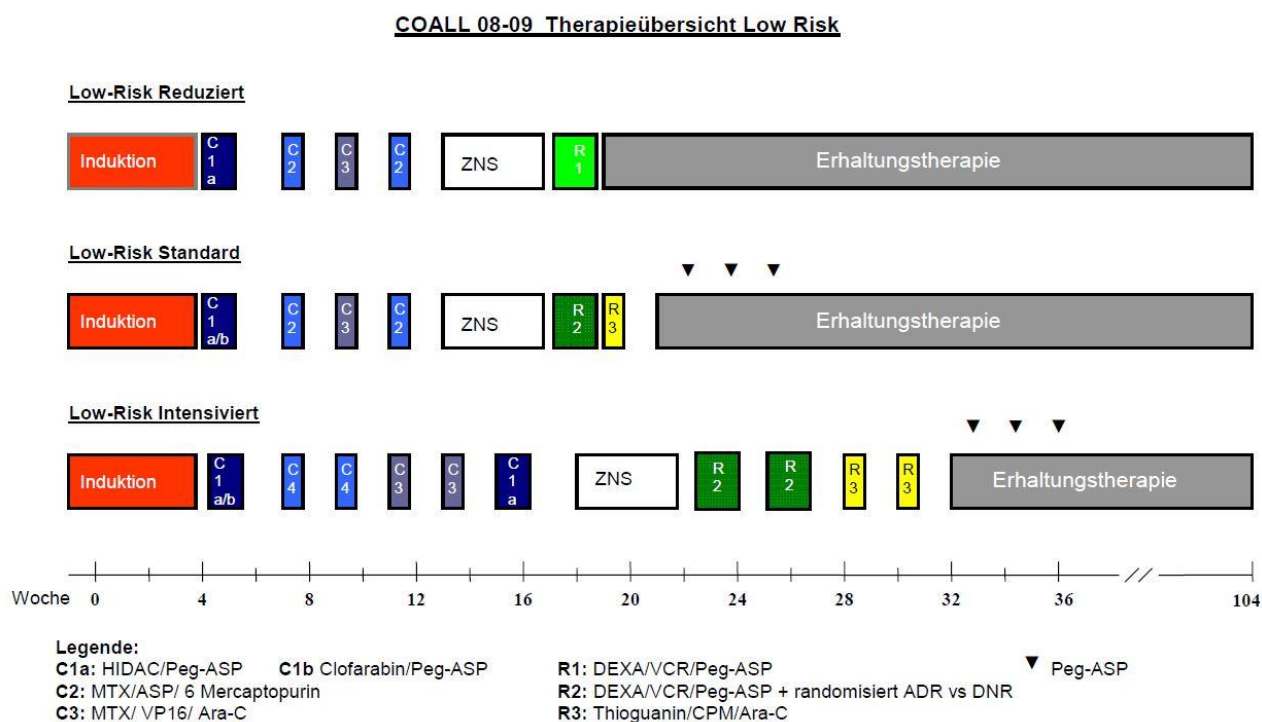


Abbildung 30: Therapieprotokoll von Low Risk Patienten entlang dem CoALL-08/09 Protokoll

Medikamentöses Vorgehen in der pädiatrischen B-ALL Therapie wird hier anhand von aufeinanderfolgenden Blöcken entlang einer definierten Zeitachse dargestellt. HIDAC: High Dose Ara-C ; Peg-ASP: Pegylierte Asparaginase; MTX: Methotrexat; ASP: Asparaginase; VP16: Etoposid; Ara-C: Cytarabin; CPM: Cyclophosphamid; AEP: Amsacrin, Etoposid, Methylprednisolon ; DEXA: Dexamethason; VCR: Vincristin; ADR: Adriamycin; DNR: Daunorubicin

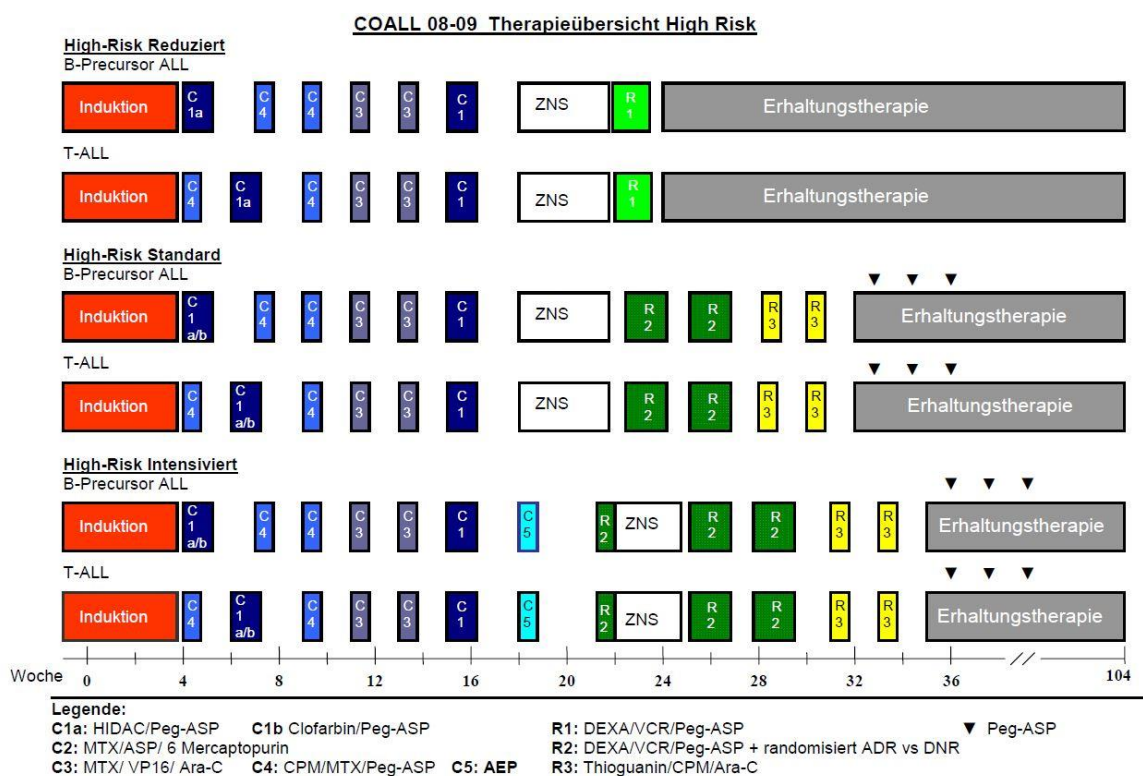


Abbildung 31: Therapieprotokoll von High Risk Patienten entlang dem CoALL-08/09 Protokoll

Medikamentöses Vorgehen in der pädiatrischen B-ALL Therapie wird hier anhand von aufeinanderfolgenden Blöcken entlang einer definierten Zeitachse dargestellt. HIDAC: High Dose Ara-C ; Peg-ASP: Pegylierte Asparaginase; MTX: Methotrexat; ASP: Asparaginase; VP16: Etoposid; Ara-C: Cytarabin; CPM: Cyclophosphamid; AEP: Amsacrin, Etoposid, Methylprednisolon ; DEXA: Dexamethason; VCR: Vincristin; ADR: Adriamycin; DNR: Daunorubicin

9 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Relative Häufigkeiten der an das Deutsche Krebsregister gemeldeten kindlichen Krebserkrankungsfälle nach Diagnose-Hauptgruppen</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 2: Knochenmarkausstrich eines Kindes mit akuter lymphoblastischer Leukämie</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 3: Gesamtüberleben bei Standardrisikopatienten von 1990-2005</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 4: Therapieschema gemäß CoALL-Studienprotokoll</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 5: Spezielle Mechanismen eines Tumors für ein ungehindertes Ausbreiten</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 6: Interaktion zwischen T-Zelle und APC</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 7: Wirkmechanismus von Blinatumomab</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 8: In vitro PD-L1 Induzierbarkeit auf Blasten</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der Gatingstrategie.</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 10: Altersverteilung der Patienten bei Diagnosestellung</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 11: Expression ko-stimulatorischer Marker auf CD19⁺/CD10⁺-Blasten/ Vorläuferzellen im Knochenmark</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 12: Expression ko-inhibitorischer und cytoplasmatischer Marker auf CD19⁺/CD10⁺-Blasten/Vorläuferzellen im Knochenmark.</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 13: Expression von extrazellulärem (PD-L1) und cytoplasmatischem PD-L1 (cyPD-L1) auf CD19⁺/CD10⁺ Blasten/Vorläuferzellen im Knochenmark.</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 14: Veränderung der Checkpointexpression durch 40-stündige Expression auf Blasten von an ALL erkrankten Kindern.</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 15: Verteilung der Subpopulationen</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der CD4- und CD8-Expression auf CD3⁺ T-Zellen im Knochenmark von cALL- und Prä-B-ALL-Patienten sowie gesunden Spendern</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der T-Zell-Phänotypen auf CD3⁺ T-Zellen im Knochenmark.</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 18: Verteilung der T-Zell-Phänotypen der CD3⁺/CD4⁺ sowie CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark von gesunden Spendern und von an cALL oder Prä-B-ALL erkrankten Patienten.</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 19: Verteilung der phänotypischen Entwicklungsstadien unter CD3⁺, sowie CD3⁺/CD4⁺ und CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen bei Erstdiagnose in Hinblick auf das spätere Auftreten eines Rezidives.</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 20: Expression der Exhaustion-Marker auf CD3⁺ T-Zellen vom Typ der Effector T cells</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 21: Weitere Darstellung der CD3⁺ Effector T cells in Hinblick auf TIM-3/PD-1 doppelt positive und TIM-3/PD-1/2B4 dreifach positive Exhaustion-Marker Expression</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 22: Expression ko-inhibitorischer Marker zum Zeitpunkt der Erstdiagnose auf CD19⁺/CD10⁺ Zellen bei ALL Patienten mit Rezidiv im Verlauf, verglichen mit ALL Patienten ohne Rezidiv</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 23: Exhaustion-Marker Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark bei Erstdiagnose und Korrelation zu dem Auftreten eines Rezidives im Verlauf</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 24: TIM-3 overall Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 25: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von TIM-3⁺ CD3⁺/CD4⁺ Knochenmark-T-Zellen bei Erstdiagnose</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 26: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der Frequenz TIM-3⁺ CD3⁺/CD4⁺ Knochenmark-T-Zellen bei Erstdiagnose.</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 27: Rezidivfreies Überleben bei CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen mit unterschiedlichem Anteil TIM3⁺/PD-1⁺ Zellen</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 28: Expression ko-inhibitorischer Marker auf CD19⁺/CD10⁺ Zellen von gesunden Spendern in Hinblick auf den Geschlechterunterschied</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 29: Etablierung einer Immunfluoreszenzfärbung</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 30: Therapieprotokoll von Low Risk Patienten entlang dem CoALL-08/09 Protokoll</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 31: Therapieprotokoll von High Risk Patienten entlang dem CoALL-08/09 Protokoll</i>	<i>94</i>

10 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Einteilung der ALL</i>	12
<i>Tabelle 2: Spezifische Oberflächenmarker der B-Zell-Leukämietypen</i>	12
<i>Tabelle 3: 1. Risikostratifizierung gemäß CoALL-Protokoll 08-09 bei Diagnosestellung</i>	15
<i>Tabelle 4: Übersicht der in dieser Studie untersuchten Immuncheckpoints</i>	22
<i>Tabelle 5: Auflistung der Panel-Zusammenstellung</i>	37
<i>Tabelle 6: Beschreibung der verwendeten Signifikanzniveaus</i>	43
<i>Tabelle 7: Charakteristika der Patienten und gesunden Probanden</i>	44
<i>Tabelle 8: Darstellung der signifikanten Unterschiede auf T-Zellen zwischen gesunden Kindern und ALL Patienten</i>	58
<i>Tabelle 9: Übersicht über die geprüften Exhaustion-Marker Kombinationen auf verschiedenen T-Zell Subpopulationen von Patienten mit und ohne Rezidiv im Verlauf. Mit (n) markierte Ergebnisse basieren auf einem Expressionsniveau von <5 %</i>	66
<i>Tabelle 10: TIM-3-Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark vs. Auftreten eines Rezidivs im Verlauf der Erkrankung</i>	68
<i>Tabelle 11: Vierfeldertafel der overall TIM-3-Expression auf CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark bezüglich Auftreten eines Rezidives im Verlauf der Erkrankung</i>	69
<i>Tabelle 12: Vierfeldertafel zur Analyse der Vorhersagekraft eines hohen Anteils TIM3⁺/PD-1⁺ doppelt positiver Zellen von allen CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark der Patienten</i>	71

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Die Rolle von Checkpointmolekülen für Prognose und Therapie der kindlichen akuten lymphoblastischen Leukämie“ selbstständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

München, den 04.03.2021

Mareike Lepenies

12 Danksagung

Ich danke allen voran meiner Betreuerin Franzi für ihre Ideen und ihre Geduld sowie der gesamten Arbeitsgruppe für ihre vielen Hilfestellungen und Aufmunterungen in einem Laboralltag mit ständigen Hochs und Tiefs.

Zudem danke ich meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen konnte.